

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE GENES SUPRESORES  
TUMORALES REGULADOS POR CDC42 EN CÁNCER  
COLORRECTAL**

TESIS DOCTORAL

FÁTIMA VALDÉS MORA

Madrid, 2008



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

## **Identificación de genes supresores tumorales regulados por Cdc42 en cáncer colorrectal**

Memoria que presenta **Dña. Fátima Valdés Mora,**  
Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor

Directores de la Tesis:

**Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán**  
Profesor de Investigación

**Dra. Teresa Gómez del Pulgar Garrote**  
Investigador contratado

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM  
C/Arturo Duperier 4, 28029 Madrid





UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE MADRID

CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS



Por la presente, el **Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán**, Profesor de Investigación del CSIC y la **Dra. Teresa Gómez del Pulgar**, Investigador contratado del CSIC certifican que:

**Dña. Fátima Valdés Mora**, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado su Tesis Doctoral titulada **“Identificación de genes supresores tumorales regulados por Cdc42 en cáncer colorrectal”**, bajo nuestra dirección, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, y en el Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Consideramos que la presente Tesis Doctoral reúne a nuestro juicio las condiciones de originalidad y rigor necesarios y, por lo tanto, se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor.

Para que así conste, firmamos la presente autorización para la defensa de esta Tesis en Madrid a veintinueve de Octubre de dos mil ocho.

Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán  
Director de la Tesis  
Profesor de Investigación,  
CSIC

Dra. Teresa Gómez del Pulgar Garrote,  
Director de la Tesis  
Investigador contratado,  
CSIC

Dr. Luis del Peso Ovalle,  
Tutor de la Tesis,  
Profesor Titular Departamento de Bioquímica  
Universidad Autónoma de Madrid



El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” y en el Centro Nacional de Biotecnología, pertenecientes al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid. Ha sido dirigido por el Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán (Profesor de Investigación del CSIC) y la Dra. Teresa Gómez del Pulgar Garrote (Investigador contratado del CSIC), con la Tutoría del Dr. Luis del Peso Ovalle (Profesor titular del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid).

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a una beca FPU, concedida a Fátima Valdés Mora por la Dirección General de Universidades, Consejería de Educación del Ministerio de Ciencia e Innovación.





*A mi abuelo Eusebio*



***“Stay hungry, stay foolish”***

Steve Jobs.



## **AGRADECIMIENTOS**



## Agradecimientos

Parece mentira que ya hayan pasado cuatro años... me pongo delante del ordenador y no sé por dónde empezar, son tantas cosas, tantas experiencias, tantas alegrías, penas, tantos cafés, tantas amistades... las tesis no es sólo trabajo, no es sólo ciencia, es mucho más que eso, en este tiempo he aprendido muchísimo, más de lo que hubiese imaginado aquel 1 de septiembre del 2004 cuando entré en el 1.10. Tras cuatro años de duro trabajo y de grandes e importantes decisiones, me doy cuenta que ya no soy la misma, esto te hace crecer y madurar como persona. Durante este tiempo han pasado por mi vida muchas personas a las que tengo mucho que agradecer, y que tienen mucho que decir en esta tesis, tanto por sus consejos como por sus ánimos, su ayuda incondicional y sobre todo por creer en mí.

Gracias Juan Carlos Lacal, por brindarme la oportunidad de realizar la Tesis en tu laboratorio, por confiar en mí, por valorar mi trabajo, por tus sabios consejos y por enseñarme a hacer ciencia pero sobre todo a disfrutar de ella. Gracias Tere, desde el primer día formamos un gran equipo, tú, mi gran maestra, he aprendido muchísimo de ti, tú has sido mi ejemplo a seguir; gracias por la confianza que siempre has tenido en mí, por tus consejos de la vida, por ser antes que jefa una amiga y por apoyarme en todas mis ilusiones. Gracias a toda la gente del labo, a los que estuvieron y a los que están, el 1.10 no sería 1.10 (bueno lab 35), sin la peculiaridad y lo especial que aporta cada uno. Mary Angels, la mami de todos, la que tiene ojos en la nuca y se entera de todo, qué sería de tus “grititos”, tus comentarios acertados y tus frases hechas (se que es grata mi compañía pero... ¿cómo seguía?), gracias Mary Angels por cuidarme tanto, por ser el “peazo” de pan que eres y por tener tanta paciencia conmigo cuando dejo tu sitio hecho una pocilga o se me olvida que soy la “exclava”. Gracias Pez, por ser mi maestro y yo tu Padawan, por esos laaarrrgooosss cafés y esas largas conversaciones donde todos los problemas se volvían más sencillos y donde tooodo tenía solución, gracias por ayudarme tanto y por saber que siempre puedo contar contigo. Gracias Rosita, por ser tan buena persona, por ayudarme de forma incondicional siempre que lo he necesitado, aunque ya lo sabes te lo recuerdo, vales un montón!!. Gracias Mary Luuu, por esas largas conversaciones en labo y fuera de él, sobre todo fuera de él, 108, 108 yupiiii!!! no hay foto no hay foto!!! oeoeoe. Gracias Anita, por tus consejos y tu saber escuchar, por estar ahí cuando se te ha necesitado. Gracias Arancha, ACA, Treonina, por la visión que le das a las cosas, por tu determinación y por tener las ideas claras, me has dado mucho ejemplo. Gracias Lur, por la alegría que le das a todo, por luchar a contra corriente para que las cosas en el labo marchen. Gracias Francillo, por ser

un ejemplo de ilusión y tesón en el trabajo, por la alegría propia del sur que le das a las cosas (¡¡¡Diooooooooo!!!). Gracias al resto de gente del labo que hace que cada día sea diferente al anterior, gracias a Adela la nueva peque-power; a Iciar una persona como pocas con un humor irónico y un gran optimismo, a Tami la chica que vale para todo y siempre esta dispuesta, a Jacin una persona genuina y digna de conocer, a Patri una tía genial que nunca te pondrá mala cara y a Alex el hombre de las relaciones cibernéticas humanas. A los ex-1.10, gracias de todo corazón Sarita, por tu alegría contagiosa y por ser una persona con la que se puede contar, Quilli-tae, mi hermanita mayor, porque tu forma de ser, tu entrega a los demás y tu alegría espontánea nos contagió a todos, a Carol, todo un ejemplo de trabajo y tesón, te echamos de menos Keirol y te envidio mucho por la gran aventura que decidiste emprender!! Tampoco se me olvidan los recién llegados al labo, Rodolfo, Noemí, David Tatay y Luis.

Por supuesto no puedo olvidar a la maravillosa gente que tuve la oportunidad de conocer en Pamplona, Eva ya te lo dije, gran parte de esta tesis ha sido gracias a tí, nunca olvidaré aquel día donde saltábamos como locas al ver que por fin la MSP de ID4 había salido; gracias Jesús, Fonci, por siempre estar dispuesto a echarnos una mano y acogerme con los brazos abiertos en vuestro labo. Recordar también a Hans Guido Wendel que me acogió en su laboratorio en mi maravillosa estancia en New York.

Gracias a todos mis amigos, que aunque muchos de ellos nunca han llegado entender qué hacía con las células ni con los genes, siempre han valorado mi trabajo, gracias a Pa, Martita, Borja, Faxter, Palomita, Jorge, Javi, Toni, Carol, Dudu, Inés, Lucas, Cristofó, Pablo... y a todos “los de los scouts” que me dejó. A mis chicos bioquímicos, Jorge, María Cortes, Vane, María Salazar, Amaya, Ángel... A mis amigas neoyorquinas, donde viví junto a ellas una experiencia irrepetible e inolvidable, Pilar y Bea.

Como organismo, no quería dejar pasar la oportunidad de expresar mi gratitud a la Dirección General de Universidades e Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación, por suministrarme mi sustento durante estos años y gracias al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por toda la infraestructura de sus centros, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” y Centro Nacional de Biotecnología. Sobre todo poniendo énfasis a sus servicios que han facilitado el desarrollo de mi investigación.

Gracias a mi familia, mis padres, Javier y Elisa, mis hermanos, Irene, Jacobo y Rodrigo, y mi cuñado Bosco, por vivir esta gran aventura junto a mí. Gracias papá por animarme en los momentos difíciles de la tesis, por apreciar tanto mi trabajo y tratar de ayudarme en todo momento y por estar siempre ahí cuando te he necesitado. Gracias



mamá, por ser un ejemplo para mí por tu bondad y por hacer todo lo que está en tu mano para que seamos felices. Gracias I, por ser hermana mayor-mejor amiga, como siempre bromeamos pero es verdad, trato de seguir tus pasos y aprender de ti. Gracias Jaco, porque me muestras constantemente que todo lo malo tiene una cara alegre, que ante la adversidad hay que plantar cara y ser valiente. Gracias Rorro, el pequeñín porque eres puro cariño, aunque a veces te cueste mostrarlo, gracias por hacerme sentir que puedes aprender de mí y que confías en mí. Gracias a mi abuelo Eusebio, por vivir con la misma intensidad que yo mis ilusiones, por apoyarme en todas las ambiciones que me he marcado desde que era pequeña, aún recuerdo cuando me regalaste las zapatillas de ballet cuando el ballet era mi mayor ilusión, gracias abuelo por ser la persona que fuiste, un ejemplo para mí en la vida.

Gracias Peluso, por ser quien eres, por compartir la vida conmigo, por haber estado a mi lado incondicionalmente en los momentos duros, por cruzar junto a mí el puente de Brooklyn. Gracias a ti cada día que pasa mis sueños se van haciendo realidad, juntos sumamos más que dos, esta Tesis también es tuya. I´m with you.



## **RESUMEN**



## Resumen

Cdc42, un miembro de la familia de GTPasas Rho, está implicado en la regulación de diversas funciones celulares como son la reorganización del citoesqueleto de actina, el tráfico de membranas, la progresión del ciclo celular y la regulación de la transcripción génica. En este trabajo se describe por primera vez la sobreexpresión de Cdc42 en tumores colorrectales humanos y su asociación con parámetros de malignidad tumoral. Asimismo, se ha analizado el papel específico de Cdc42 en el desarrollo y progresión de este tipo tumoral a través de la tecnología de microarrays de expresión génica. El análisis comparativo de las células SW620 sobreexpresando Cdc42 *versus* células SW620 con niveles disminuidos de expresión de Cdc42 por shARN, demuestra que esta GTPasa es capaz de silenciar la transcripción de los potenciales genes oncosupresores en cáncer colorrectal: CACNA2D2, KIAA1456, p16INK4a, ID4 y TWIST1. El análisis del estado de metilación de los promotores de estos genes demuestra que Cdc42 silencia la transcripción de p16INK4a, ID4 y TWIST1 a través de la hipermetilación de sus promotores, pero por un mecanismo distinto en el caso de los genes CACNA2D2 y KIAA1456. El silenciamiento transcripcional de estos genes en una serie de líneas celulares de cáncer colorrectal humano sugiere un papel de supresores tumorales. En muestras clínicas, los genes p16INK4a y TWIST1 se encuentran sobreexpresados en los tejidos tumorales de forma significativa, pero independientemente de la expresión de Cdc42. Se ha visto que la expresión positiva de p16INK4a en el tejido tumoral se localiza en lugares específicos relativos al borde invasivo del tumor, donde las células presentan una baja tasa de proliferación. La sobreexpresión de TWIST1 se correlaciona con la invasión a nódulos linfáticos y presenta una expresión específica en zonas del tumor donde existen células sufriendo la transición epitelio-mesénquima, siendo el primer estudio realizado sobre la relevancia de TWIST1 en cáncer colorrectal. Por otro lado, los genes CACNA2D2, KIAA1456 e ID4 se encuentran silenciados de forma significativa en muestras clínicas, asociándose, en el caso de CACNA2D2 y KIAA1456, con un fenotipo más agresivo. Esto supone la primera evidencia de la expresión de CACNA2D2 en este tipo tumoral. La pérdida de expresión de los genes KIAA1456 e ID4 se encontró estadísticamente significativa asociada con la expresión de Cdc42. El trabajo presentado sugiere que Cdc42 podría jugar un papel clave en el desarrollo del cáncer colorrectal y la inhibición específica de su actividad podría ser crucial en la progresión de esta enfermedad, constituyendo una nueva potencial diana terapéutica.

## Summary

Cdc42, a member of Rho GTPases family, is involved in the regulation of several cellular functions, such as rearrangement of actin cytoskeleton, membrane trafficking, cell-cycle progression, and transcriptional regulation. This is the first study where overexpression of Cdc42 and its association with malignancy in human colorectal cancer is reported. Additionally, the specific role of Cdc42 in development and progression of colorectal cancer has been analyzed through gene expression microarrays technology. A comparative analysis of Cdc42 overexpressing SW620 cells *versus* SW620 cells with decreased Cdc42 levels through shRNA has revealed that Cdc42 is able to downregulate the putative tumor suppressor genes in colorectal cancer: CACNA2D2, KIAA1456, p16INK4a, ID4 and TWIST1. Promoter methylation analyses of these genes demonstrate that Cdc42 silences the transcription of p16INK4a, ID4 and TWIST1 genes through promoter hypermethylation. Transcriptional silencing of these genes has been found in several human colorectal cell lines suggesting a *bonafide* tumor suppressor role for all of these genes. In clinical samples, p16INK4a and TWIST1 genes are significantly up-regulated in tumoral tissues. Despite there is not association between p16INK4a expression and Cdc42 levels, there is a positive expression of p16INK4a in specific regions of the tumoral tissues corresponding to the invasive tumor front where proliferation is lower. Although not correlation has been found with Cdc42 expression levels it is observed that TWIST1 overexpression is correlated with lymph node invasion and it is specifically localized in tumor areas where cells are undergoing epithelial-mesenchymal transition. Taken together these evidences, this is the first report about the relevance of TWIST1 in colorectal cancer. On the other hand, CACNA2D2, KIAA1456 and ID4 genes have been found significantly downregulated in clinical specimens; in the case of CACNA2D2 and KIAA1456 such silencing is associated with an aggressive phenotype. These results provide the first contribution about CACNA2D2 expression levels in this tumor type. Cdc42 association was found statistically significant with the expression of KIAA1456 and ID4 genes. Altogether, these results provide a strong evidence for Cdc42 having a role in the development of colon cancer. Furthermore, inhibition of Cdc42 activity may have a direct impact in the management of this disease, being this GTPase a novel molecular target for colorectal cancer treatment.

## ÍNDICE





# Índice

1	<b>Abreviaturas</b>	-1-
2	<b>Introducción</b>	-7-
2.1	El cáncer	-9-
2.2	Cáncer colorrectal	-10-
2.3	Bases moleculares del cáncer colorrectal	-13-
2.3.1	<i>Alteraciones de oncogenes en el desarrollo de CCR</i>	-14-
2.3.2	<i>Mecanismos de supresión tumoral en el desarrollo de CCR</i>	-15-
2.4	Epigenética del cáncer	-17-
2.5	La familia de las GTPasas Rho	-20-
2.6	Las GTPasas Rho en cáncer humano	-22-
2.7	Implicación de Cdc42 en tumorigénesis	-24-
2.7.1	<i>Generalidades</i>	-24-
2.7.2	<i>Papel en cáncer</i>	-25-
3	<b>Objetivos</b>	-29-
4	<b>Materiales y Métodos</b>	-33-
4.1	Muestras de pacientes	-35-
4.2	Extracción de proteína total procedente de tejidos humanos y de ratón	-35-
4.3	Extracción de proteína total procedente de líneas celulares	-36-
4.4	Separación electroforética de proteínas procedentes de tejidos o de líneas celulares e Inmunodetección (Western Blot)	-36-
4.5	Cultivos celulares y reactivos	-37-
4.6	Vectores de expresión y transfecciones	-38-
4.6.1	<i>Transfecciones estables</i>	-39-
4.6.2	<i>Transfecciones transitorias</i>	-39-
4.7	Extracción de ARN total procedente de líneas celulares y de tejidos humanos	-39-
4.8	Análisis del perfil de expresión génica diferencial por microarrays de ADNc	-40-
4.8.1	<i>Diseño de la plataforma de array</i>	-40-
4.8.2	<i>Descripción del diseño experimental</i>	-40-
4.8.3	<i>Marcaje e hibridación de las muestras</i>	-42-
4.8.4	<i>Detección y cuantificación de la señal</i>	-42-
4.8.5	<i>Procesamiento de datos y análisis estadístico</i>	-43-
4.9	RT-PCR semicuantitativa	-44-
4.10	PCR a tiempo real	-45-
4.11	Extracción de ADN procedente de líneas celulares y de tejidos humanos. Modificación del ADN por tratamiento con bisulfito sódico	-46-
4.12	PCR Específica de Metilación (MSP)	-47-
4.13	PCR y Secuenciación tras modificación con Bisulfito (BSP)	-47-
4.14	Ensayos de tumorigénesis <i>in vivo</i>	-49-
4.15	Inmunohistoquímica	-49-
4.16	Análisis estadístico	-50-
4.17	Consideraciones éticas	-50-
5	<b>Resultados</b>	-51-
5.1	Estudio de los niveles de expresión de Cdc42 en muestras de pacientes con cáncer colorrectal	-53-
5.1.1	<i>Cdc42 se encuentra significativamente sobreexpresado en</i>	

<i>cáncer colorrectal</i>	-53-
5.1.2 <i>Los niveles de Cdc42 se asocian con el número de ganglios afectados por el tumor y con el grado de diferenciación</i>	-54-
5.2 Selección de una línea de cáncer colorrectal como modelo de estudio in vitro del papel de Cdc42	-56-
5.3 Generación de clones estables de sobreexpresión e interferencia de Cdc42	-58-
5.4 Identificación de las dianas transcripcionales de Cdc42 en la línea SW620. Microarrays de expresión génica	-60-
5.5 Reexpresión de los posibles genes supresores tumorales, TWIST1, CACNA2D2, CBS, ID4 y KIAA1456 por la interferencia de Cdc42 en la línea SW620.	-66-
5.6 Estudio del mecanismo de regulación transcripcional mediado por Cdc42 de los posibles genes supresores tumorales TWIST1, ID4, CACNA2D2 y KIAA1456	-68-
5.7 Cdc42 regula la transcripción de p16INK4a en la línea SW620	-74-
5.8 Estudio del mecanismo de regulación epigenética mediada por Cdc42. Regulación de las DNMTs	-76-
5.9 Reversión del fenotipo en los clones de interferencia de Cdc42	-77-
5.10 La disminución de los niveles de Cdc42 es determinante en la velocidad del crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos	-79-
5.11 Estudio de la expresión de los genes CACNA2D2, KIAA1456, TWIST1, p16INK4a e ID4 en un panel de líneas derivadas de cáncer colorrectal humano	-82-
5.11.1 <i>CACNA2D2 se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos analizadas</i>	-83-
5.11.2 <i>KIAA1456 se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos analizadas</i>	-83-
5.11.3 <i>P16INK4a se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos analizadas debido a la hipermetilación de su promotor</i>	-85-
5.11.4 <i>TWIST1 se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos debido a la hipermetilación de su promotor</i>	-85-
5.11.5 <i>ID4 se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos analizadas debido, principalmente, a la hipermetilación de su promotor</i>	-86-
5.12 Estudio de la expresión de los genes CACNA2D2, KIAA1456, p16INK4a, TWIST1 e ID4 en tumores colorrectales humanos y de su posible asociación con Cdc42	-88-
5.12.1 <i>CACNA2D2 se encuentra silenciado en las muestras tumorales analizadas de pacientes con cáncer colorrectal y sus niveles se asocian con diversos parámetros clínico-patológicos</i>	-89-
5.12.2 <i>KIAA1456 se encuentra silenciado en las muestras tumorales analizadas de pacientes con cáncer colorrectal y su expresión se asocia con Cdc42 y con el grado de diferenciación histopatológico</i>	-92-
5.12.3 <i>P16INK4a se encuentra sobreexpresado en las muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal y su expresión se asocia con los bordes invasivos del tumor</i>	-95-
5.12.4 <i>TWIST1 se encuentra sobreexpresado en las muestras tumorales analizadas de pacientes con cáncer colorrectal y su</i>	

	<i>expresión se asocia con el sexo de los pacientes y la invasión a ganglios linfáticos</i>	-97-
	<i>5.12.5 La pérdida de expresión de ID4 se asocia a la sobreexpresión de Cdc42 en las muestras tumorales analizadas de pacientes con cáncer colorrectal</i>	-101-
6	<b>Discusión</b>	-105-
	6.1 Expresión de Cdc42 en cáncer colorrectal y su asociación con parámetros clínico-patológicos	-107-
	6.2 Mecanismos moleculares relacionados con el efecto oncogénico de Cdc42 en cáncer colorrectal	-108-
	6.3 Cdc42 silencia la expresión de CACNA2D2 y KIAA1456 en CCR	-110-
	6.4 Cdc42 silencia la expresión de genes supresores mediante mecanismos epigenéticos	-113-
	6.4.1 Silenciamiento de p16INK4a	-113-
	6.4.2 Silenciamiento de TWIST1	-114-
	6.4.3 Silenciamiento de la expresión de ID4	-116-
	6.5 Hipótesis de regulación epigenética de ID4, TWIST1 y p16INK4a mediada por Cdc42	-117-
	6.6 Cdc42 como potencial diana terapéutica en CCR	-120-
7	<b>Conclusiones</b>	-123-
8	<b>Bibliografía</b>	-127-
9	<b>Anexo</b>	-151-
	9.1 Publicaciones que forman parte de la Tesis	-153-
	9.2 Otras publicaciones durante el desarrollo de la Tesis	-153-



## **ABREVIATURAS**



## 1 Abreviaturas

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ADNc:** ADN complementario
- **AJCC:** Comité Conjunto Americano de Cáncer
- **AKT:** homólogo al oncogen viral de timoma murino
- **APC:** Adenomatous Polyposis Coli
- **ATCC:** *American Type Culture Collection*
- **ARNi:** ARN de interferencia
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **bHLH:** hélice bucle hélice básico
- **BMI1:** Homólogo 1 del lugar de inserción Mo-MVL de linfoma B
- **BSA:** Seroalbúmina bovina
- **BSP:** Secuenciación tras modificación con bisulfito
- **CACNA2D2:** Subunidad 2 alfa2delta, de canal de calcio dependiente de voltaje
- **CAG:** Centro de Genómica Aplicada
- **CBS:** Cistatitina beta sintasa
- **CBX:** Homólogo de cajas chromo
- **CCR:** Cáncer Colorrectal
- **Cdc42:** Proteína de ciclo de división celular 42
- **CDK:** Quinasa dependiente de ciclina
- **CDX2:** Proteína homeobox 2 tipo caudal
- **CIMP:** Fenotipo metilador de islas CpG
- **c-Myc:** Oncogén de la mielocitomatosis celular
- **COX-2:** Ciclooxygenasa 2
- **DCC:** Delecionado en carcinoma colorrectal
- **DMEM:** Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco
- **DNMTs:** ADN metiltransferasas
- **DTT:** Ditiotretitol
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- **EGF:** Factor de crecimiento epidérmico
- **EMEM:** Medio Esencial Mínimo *Eagle*

- **EMSA:** Ensayo de retraso en la movilidad electroforética en gel
- **EMT:** Transición Epitelio-Mesénquima
- **FAP:** Poliposis Adenomatosa Familiar
- **FBS:** Suero fetal bovino
- **F12K:** Medio de cultivo F-12 de Ham modificado por Kaighn
- **GAP:** Proteína activadora de la actividad GTPasa
- **GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- **GDI:** Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
- **GDP:** Guanosin difosfato
- **GEF:** Factor de Intercambio de Guanina
- **GTP:** Guanosin trifosfato
- **HDACs:** Histona deacetilasas
- **HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
- **hMLH1:** Homólogo mutL 1
- **hMSH:** Homólogo mutS
- **HMTs:** Histona metiltransferasas
- **HNPCC:** Cáncer Colorrectal Hereditario No Poliposo
- **ID4:** Inhibidor de la unión al ADN 4
- **IGF2:** factor de crecimiento de insulina 2
- **INE:** Instituto Nacional de Estadística
- **IPA:** *Ingenuity Pathways Analysis*
- **JNK:** Quinasa del N-terminal de Jun
- **kb:** kilobase
- **KO:** Knock Out
- **LCM:** Microdisección por captura láser
- **LOH:** Pérdida de heterozigosidad
- **M:** Metilado
- **MBPs:** Proteínas de unión a grupos metilo
- **MEFs:** Fibroblastos embrionarios murinos
- **MGMT:** ADN metiltransferasa O-6-metilguanina.
- **MMR:** genes de reparación por desajustes en el ADN



- **MRCK:** Serin-treonin protein quinasa relativa a la proteína quinasa de distrofia miotónica
- **MSP:** PCR específica de metilación
- **NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica
- **NJIT:** Instituto de Tecnología de *New Jersey*
- **NJMS:** Escuela de Medicina de *New Jersey*
- **NSCLC:** Cáncer no microcítico de pulmón
- **pb:** Pares de bases
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **PAGE-SDS:** condiciones desnaturalizantes y reductoras de SDS
- **PBGD:** Deaminasa porfobilinógeno
- **PBS:** Tampón fosfato salino
- **PcG:** Grupo de proteínas polycomb
- **PCR:** Reacción en cadena de la ADN polimerasa
- **PI3K:** Fosfoinosítido 3 quinasa
- **PKC:** Proteína quinasa C
- **PMSF:** Fenilmetilsulfonil fluoruro
- **PRC:** Complejo represor polycomb
- **Q- MSP:** MSP cuantitativa.
- **QM-MSP:** MSP cuantitativa Multiplex.
- **p16INK4a:** Inhibidor 2A de quinasas dependientes de ciclina
- **p21Cip1:** Inhibidor 1A de quinasas dependientes de ciclinas
- **ROC:** *Receiver Operating Characteristic*
- **RPMI:** Instituto Memorial *Roswell Park*
- **RT-PCR:** Transcripción Reversa – Reacción en cadena de la polimerasa
- **SAH:** S-adenosinhomocisteína
- **SAM:** S-adenosilmetionina
- **SDS:** Dodecil sulfato de sodio
- **shARN:** horquilla de ARN de interferencia
- **SMAD:** Proteína relativa a Sma y Mad
- **SSC:** Tampón compuesto por cloruro sódico y citrato sódico
- **STAT3:** Transductor de la señal y activador de la transcripción 3

- **TNM:** Tumor-Nódulo-Metástasis
- **T-TBS:** 20mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 0,05% Tween-20
- **TSA:** Tricostatina A
- **U:** No metilado
- **UICC:** Unión Internacional Contra el Cáncer
- **UMDNJ:** Universidad de Medicina y Odontología de New Jersey
- **YY1:** Yin Yang 1

## **INTRODUCCIÓN**



## 2 Introducción

### 2.1 El cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad ha supuesto 7,9 millones de muertes en 2007, esto es, alrededor del 13% de todas las muertes a nivel mundial. Se prevé que estas cifras continúen aumentando, estimándose que, a lo largo del año 2030, 12 millones de personas morirán a causa del cáncer.

Los principales tipos de tumores que lideran la mortalidad por cáncer cada año son: pulmón, estómago, colon, hígado y mama.

Concretamente en España, datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) destacan que en el año 2006, el 27,4% de las muertes fueron causadas por la enfermedad del cáncer, suponiendo la principal causa de muerte por debajo de los 80 años de edad.

El cáncer, es un término genérico utilizado para denominar a un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. Desde el punto de vista genético, es una enfermedad que implica una serie de cambios dinámicos en el genoma. Así, se han descubierto mutaciones que activan oncogenes, los cuales presentan una ganancia aberrante de su función; y mutaciones que desactivan genes supresores tumorales, que presentan una pérdida recesiva de su función. El desarrollo de un tumor sigue un proceso muy similar a la evolución Darwiniana, en el cual la acumulación de alteraciones genéticas, cada una de las cuales confiere uno o varios tipos de ventaja en el crecimiento, dan lugar a una conversión progresiva de una célula normal a una cancerosa, pasando por situaciones intermedias de célula pre-cancerosa.

Revisando las principales causas moleculares que desembocan en el desarrollo del cáncer, los autores Hanahan y Weinberg describieron que la gran mayoría de los tipos humanos de cáncer comparten un pequeño número de aspectos moleculares, bioquímicos y celulares (Hanahan & Weinberg, 2000). La base de esta afirmación es que las células cancerígenas presentan defectos en los circuitos de regulación que gobiernan la proliferación celular y la homeóstasis.

Por tanto, estos autores sugieren que el fenotipo de célula cancerígena se manifiesta por seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que conjuntamente dan lugar a un crecimiento maligno. Estas alteraciones son:

1. Capacidad de proliferar de una manera no regulada e independiente de señales mitogénicas.
2. Insensibilidad a la señalización antiproliferativa.
3. La evasión de la muerte celular programada (apoptosis).
4. El potencial replicativo ilimitado.
5. La capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).
6. La invasión de tejidos circundantes y la capacidad de diseminación y metástasis a órganos distantes del sitio de crecimiento original.

La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer. Por tanto, cada día se hace más imprescindible el desarrollo de nuevas herramientas y metodologías fiables de detección temprana del cáncer que ayuden a tener más precisión a la hora de tratar esta enfermedad, dando como resultado un aumento de la esperanza de vida de los pacientes.

La atención adecuada de un paciente con cáncer no es posible sin un conocimiento exhaustivo del tipo y la fase de desarrollo del tumor. En este sentido, la determinación del estadio clínico, permite al médico decidir cuál es el mejor tratamiento y predecir el pronóstico del paciente (posibilidad de curación).

La investigación de nuevas dianas con potencial uso terapéutico, así como de los mecanismos moleculares de aparición y progresión de un tumor, son por tanto fundamentales en la lucha contra el cáncer.

## 2.2 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera causa de muerte por cáncer más común en los países desarrollados tanto en hombres como en mujeres (Jemal *et al.*, 2008).

La mayoría de estos tumores colorrectales comienzan cuando en el tejido normal de la pared de la cripta de Lieberkühn se produce la hiperproliferación de las células y, a continuación, la displasia de las mismas. Esto lleva a la formación de focos aberrantes, llamados adenomas. A medida que este pólipo continúa creciendo y acumulando alteraciones neoplásicas, se forma el tumor maligno, que es denominado carcinoma. Por tanto, el CCR se desarrolla a través de etapas bien definidas a nivel histológico que van, desde lesiones en la cripta del colon a través de la formación de pólipos o adenomas, hasta manifestar el cáncer (Figura 1).

El indicador pronóstico de supervivencia en pacientes con CCR más importante es el estadio tumoral. Actualmente, el sistema de clasificación TNM (tumor-nódulo-metástasis), establecido por el Comité Conjunto Americano de Cáncer (AJCC) y la Unión Internacional

Contra el Cáncer (UICC), es el método estándar más recomendado. Esta clasificación se determina por: la profundidad que el tumor primario ha alcanzado al penetrar en las paredes del intestino (T), la presencia o ausencia de células tumorales en los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis distales (M) (Compton & Greene, 2004). Cada uno de estos estadios está subdividido en varios, los cuales se detallan a continuación (Figura 1B).

En cuanto a la información específica sobre la **penetración del tumor (T)**:

**Tis:** Se refiere al carcinoma *in situ* (también denominado cáncer *in situ*). Las células cancerosas se encuentran sólo en el epitelio o la lámina propia (capas que recubren la parte interior del colon o recto).

**T1:** El tumor ha invadido la submucosa.

**T2:** El tumor ha invadido la lámina muscular propia (capa muscular más profunda y gruesa que se contrae para activar el pasaje del contenido intestinal).

**T3:** El tumor ha crecido a través de la lámina muscular propia y en la subserosa o en los tejidos alrededor del colon o recto.

**T4:** El tumor ha invadido otros órganos o ha causado una perforación en la pared del colon o recto.

**La invasión en ganglios regionales (N)** se subdivide en las siguientes categorías:

**N0:** No se detecta metástasis de ganglios linfáticos regionales.

**N1:** Hay compromiso metastásico en uno, dos o tres ganglios linfáticos regionales.

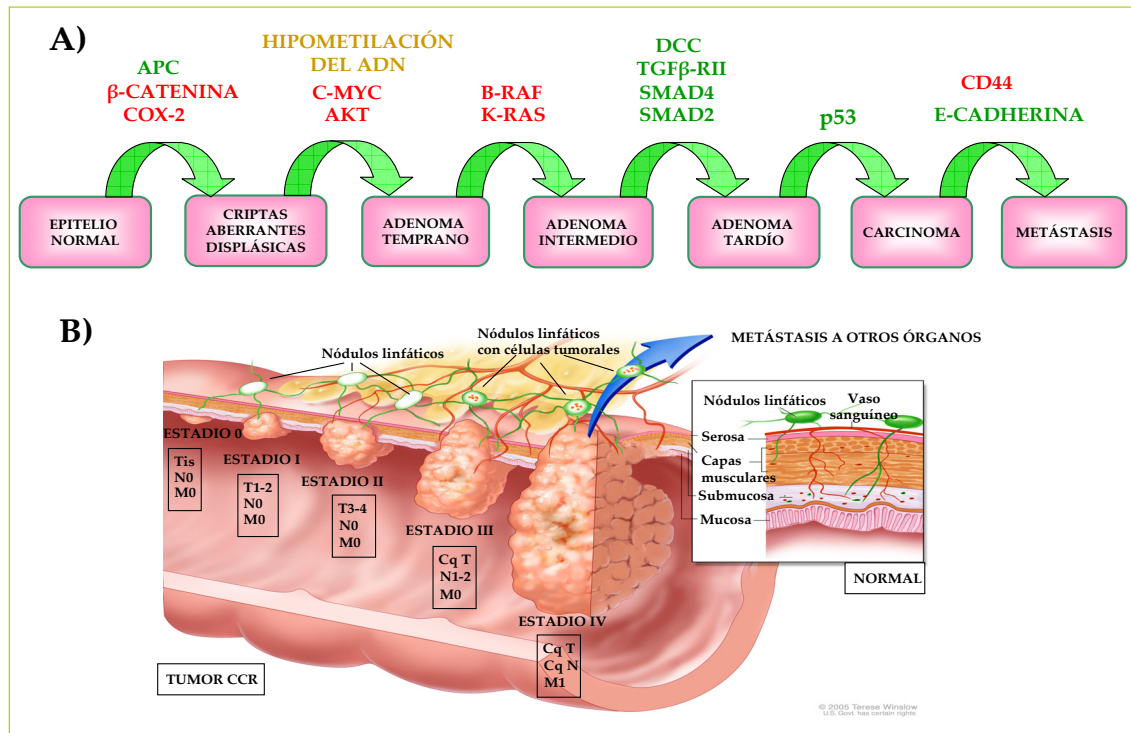
**N2:** Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos regionales.

En cuanto a **la metástasis a distancia (M)**, se subdivide en:

**M0:** La enfermedad no se ha metastatizado.

**M1:** Hay metástasis a distancia.

Según la clasificación de T, N y M que tenga cada tumor, se organizan, dentro de los estadios 0, I, II, III y IV (Compton & Greene, 2004) (Figura 1B).



**Figura 1. A) Bases moleculares de la carcinogénesis colorrectal en función de las distintas etapas histológicas:** Adaptación del modelo genético de Vogelstein donde se reflejan las alteraciones genéticas y epigenéticas más comunes. La acumulación gradual de estas alteraciones origina finalmente la metástasis. Los genes de color rojo son oncogenes activados de forma aberrante y los de color verde son oncosupresores silenciados.

**B) Estadios del CCR según la clasificación TNM de la AJCC y UICC:** Según la clasificación de T, N y M que tenga cada tumor, se organizan, dentro de los estadios 0, I, II, III y IV. Cq: Cualquier

Otra característica usada para clasificar los tumores es según el grado histopatológico (G), el cual describe el grado de diferenciación de las células tumorales. En general, los tumores mejor diferenciados tienen un mejor pronóstico. Existen datos en estudios multivariantes de la relación entre el grado de diferenciación y el pronóstico de la enfermedad. Los datos son claros cuando se comparan tumores de alto y bajo grado de diferenciación, pero subclasificaciones más precisas en los grados presentan gran variabilidad interobservador. Se clasifican según las células tumorales examinadas se encuentren, bien diferenciadas (**G1**), moderadamente diferenciadas (**G2**) o pobremente diferenciadas (**G3**).

La intervención quirúrgica es la principal modalidad de tratamiento para pacientes en estadios tempranos (desde estadio I hasta III). A medida que el estadio tumoral se incrementa en términos de profundidad de penetración del tumor en las capas intestinales e implicación de nódulos linfáticos, la posibilidad de cura únicamente por cirugía disminuye. Por tanto, las probabilidades de recurrencia local y de supervivencia dependen del estadio TNM. Así, en los casos más avanzados (estadio IV), la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años es sólo del 8% (Nelson *et al.*, 2001; O'Connell *et al.*, 2004).



El conocimiento de factores pronóstico que informen acerca de la evolución de la enfermedad o de la respuesta al tratamiento es fundamental para un correcto control de la enfermedad. En este contexto, la identificación de nuevos factores moleculares implicados en la progresión de los tumores colorrectales y asociados con los distintos estadios de la enfermedad, continúa siendo un paso crítico y necesario para un mejor entendimiento de la carcinogénesis colorrectal.

## **2.3 Bases moleculares del cáncer colorrectal**

En los últimos años se han hecho grandes avances para el entendimiento de los mecanismos moleculares que desencadenan el CCR. Este tipo tumoral es el resultado de una acumulación de alteraciones genéticas que dan como resultado la activación aberrante de oncogenes y la desactivación de genes supresores, esta última alteración es la más predominante. Durante el proceso de formación de la neoplasia tienen lugar mutaciones, deleciones cromosómicas y silenciamiento epigenético en genes que son claves en rutas de señalización fundamentales para la transformación tumoral (Fearon & Vogelstein, 1990). Las principales rutas de señalización alteradas en CCR incluyen las rutas de Wnt, TGF $\beta$ , Ras-Raf-MAPK y PI3K-AKT (Cheah, 2008).

En el desarrollo del CCR contribuyen tanto factores ambientales como hereditarios. Una simple alteración en un gen de la línea germinal puede desembocar en una marcada predisposición a padecer CCR en dos síndromes, Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) (por mutación en el gen APC) y Cáncer Colorrectal Hereditario No Poliposo (HNPCC) (por mutación en uno de los genes de reparación por desajustes en el ADN (genes MMR: hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1 y hPMS2) (Kinzler & Vogelstein, 1996). Sin embargo, estos síndromes representan sólo el 5% de todos los casos de CCR, la mayoría se originan de forma esporádica.

Vogelstein y colaboradores propusieron un modelo genético de desarrollo del cáncer colorrectal, dónde describían que era necesaria la alteración genética de un número determinado de genes en cada estadio histológico de generación del CCR. Los autores sugieren que, al menos se requiere la alteración de cuatro a cinco genes para la formación de un tumor maligno. Además afirmaban, que era el acúmulo gradual de dichas mutaciones lo que iba generando un tumor cada vez más agresivo (Fearon & Vogelstein, 1990) (Figura 1A).

Cada vez cobran mayor importancia las teorías que abogan por un inicio del proceso canceroso en las células de tejidos normales en constante renovación, como es la mucosa

colónica, y concretamente, en las células progenitoras que se encuentran en la base de las criptas intestinales. Recientemente, se ha descrito la existencia de células madre de cáncer colorrectal. Se cree que, una perturbación en su dinamismo, podría representar el primer paso hacia la tumorigénesis colorrectal (Willis *et al.*, 2008).

### 2.3.1 Alteraciones de oncogenes en el desarrollo de CCR

Durante el desarrollo del CCR se produce la activación de oncogenes cuyas funciones de sus correspondientes proteínas favorecen a la progresión tumoral. Los mecanismos de activación de oncogenes descritos para este tipo tumoral son: mutaciones, amplificaciones génicas y reordenamientos cromosómicos, siendo las mutaciones somáticas las más frecuentes (Fearon & Vogelstein, 1990).

Entre un 38 y un 50% de los tumores colorrectales tienen el gen KRAS mutado, y en un porcentaje similar, en adenomas mayores de 1 cm de longitud (Vogelstein *et al.*, 1988). Se trata de mutaciones puntuales que originan una proteína constitutivamente activa. Además, un 20% de los tumores colorrectales poseen una mutación activadora en el gen BRAF (Davies *et al.*, 2002). La complementariedad entre las mutaciones de estos dos genes (Yuen *et al.*, 2002), sitúa a la ruta Ras-Raf-MAPK como una de las principales en los carcinomas colorrectales (Figura 1A).

Por otro lado, se han descrito casos de amplificación génica de los genes NEU, MYC o MYB, en tumores colorrectales primarios o en líneas celulares derivadas de CCR (Alitalo *et al.*, 1983; Alitalo *et al.*, 1984; D'Emilia *et al.*, 1989).

También se ha descrito que se puede producir un incremento en la expresión de los productos de genes (a nivel de ARNm o proteína) asociados con la promoción del proceso tumorogénico. En este sentido, la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), que se expresa normalmente a niveles bajos en la mucosa colónica, se encuentra sobreexpresada en el epitelio hiperproliferativo (Tsunozaki *et al.*, 2002). Los niveles de proteína del proto-oncogen AKT, con una función anti-apoptótica, se han encontrado sobreexpresados en un 57% de los casos tanto en adenomas como en carcinomas colorrectales, mientras que la mucosa colónica y los pólipos hiperplásicos no presentaban una expresión significativa de AKT (Roy *et al.*, 2002). Por último, se han descrito niveles elevados de expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de fosfolípidos en un porcentaje elevado de tumores colorrectales (Ramirez de Molina *et al.*, 2002).

### 2.3.2 Mecanismos de supresión tumoral en el desarrollo de CCR

Como ya se ha señalado anteriormente, el silenciamiento de genes supresores tumorales es la alteración molecular predominante en la carcinogénesis colorrectal. Los mecanismos de silenciamiento génico más frecuentes para este tipo tumoral son las mutaciones y deleciones cromosómicas, estas últimas dan lugar a pérdidas de heterozigosidad (LOH) (Kinzler & Vogelstein, 1996). En los últimos años, el silenciamiento transcripcional epigenético ha sido propuesto como otro método de desactivación, el cual cada vez va adquiriendo mayor importancia (Jones & Baylin, 2002).

#### 1. Mutaciones con pérdida de función

Una de las principales proteínas donde se ha encontrado la pérdida de su función es APC. Esta proteína resulta truncada en el 90% de los casos debido a mutaciones en estadios iniciales de la tumorigénesis, tanto en cáncer de colon humano esporádico como hereditario (FAP) (Kinzler & Vogelstein, 1996) (Figura 1A). En el 10% restante, el gen de la  $\beta$ -catenina es el que se encuentra mutado, provocando su hiperactividad (Polakis *et al.*, 1999). Ambas mutaciones son mutuamente excluyentes, pero llevan en último término a la activación constitutiva de la ruta de Wnt.

Aproximadamente un 15% de los casos de cáncer colorrectal esporádico se caracterizan por la desactivación de alguno de los genes MMR (hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1 y hPMS2), lo que da lugar a una inestabilidad de microsatélites (Jass *et al.*, 1998).

La inactivación de la ruta de señalización de TGF- $\beta$  es otra de las características de la carcinogénesis colorrectal. La gran mayoría de tumores colorrectales poseen mutaciones de silenciamiento en alguno de los componentes de esta ruta de señalización, como el receptor tipo II (TGF- $\beta$ RII), SMAD2 o SMAD4 (Massague & Chen, 2000) (Figura 1A).

#### 2. Deleciones cromosómicas

En la neoplasia colorrectal existe una gran frecuencia de LOH. Las regiones afectadas por estas pérdidas alélicas normalmente contienen genes supresores tumorales. Las LOH en los brazos de los cromosomas 1p, 5q, 8p, 7q, 14q, 10q, 17q, 17p, 18q y 22q (Ilyas *et al.*, 1999), son las más frecuentes que se han descrito en, al menos, un 50% de los casos de CCR.

La pérdida de una gran porción del cromosoma 17p se ha descrito en el 75% de los carcinomas colorrectales (Vogelstein *et al.*, 1988). Esta región contiene el gen supresor tumoral p53 (Figura 1A).

La segunda región de pérdida alélica más común en los tumores colorrectales es el cromosoma 18q, el cual se pierde en un 70% de los carcinomas y casi en un 50% de los adenomas tardíos (Vogelstein *et al.*, 1988). En esta región se han mapeado genes supresores como DCC, SMAD2 y SMAD4 (Fearon *et al.*, 1990; White, 1998) (Figura 1A).

La pérdida alélica del cromosoma 5q, donde se localiza el gen APC, está asociado con el síndrome FAP (Bodmer *et al.*, 1987). En pacientes sin poliposis esta pérdida alélica se ha observado en un 20-50% de los carcinomas y en un 30% de los adenomas (Vogelstein *et al.*, 1988).

### **3. Metilación aberrante en las regiones promotoras de los genes supresores tumorales**

La metilación en los promotores de genes supresores tumorales es un mecanismo alternativo para el silenciamiento de genes en cáncer.

En CCR, se ha descrito la hipermetilación en los promotores de un gran número de genes, incluidos genes supresores tumorales conocidos. Cabe destacar el silenciamiento epigenético en CCR de los genes p16INK4, MGMT, hMLH1, RASSF1A y p14ARF (Kondo & Issa, 2004) (Tabla 1). En el siguiente apartado se hablará más en profundidad de la epigenética en CCR.

### **4. Genes con pérdida en la función sin alteraciones genéticas o epigenéticas**

Se ha encontrado que muchas proteínas presentan alterados los niveles de expresión o de actividad en tumores y, sin embargo, no presentan cambios a nivel de mutaciones ni a nivel epigenético. Estos cambios deberían tener una base genética o epigenética, aunque de forma indirecta, posiblemente ocurran a través de mutaciones en otros genes que se encuentran por encima de una ruta de señalización común y clave en la progresión tumoral. Por ejemplo, la pérdida de expresión génica o de proteína Cdx-2 en CCR no es debida ni a mutaciones ni a metilación del promotor, sino que es a través de un mecanismo *in trans* que aún se desconoce (Hinoi *et al.*, 2003). El silenciamiento de E-cadherina se ha descrito en CCR, y a pesar de que parece que su mecanismo de supresión es a través de la hipermetilación de su promotor (Garinis *et al.*, 2002), en cáncer de mama se ha demostrado

que también puede deberse a la alteración de los represores transcripcionales SLUG, SNAIL y TWIST (Batlle *et al.*, 2000; Hajra *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004).

Símbolo del gen	Nombre del gen	Localización cromosómica	Metilación en cáncer colorrectal (%)
COX-2	Ciclooxigenasa tipo 2	1q25.2-q25.3	10-20
CSPG2	Versican	5q14.3	70
ER $\alpha$	Receptor de estrógeno alfa	6q25.1	> 90
TMEFF2	Proteína transmembrana con dominios tipo EGF y dos tipo follistatina 2	2q32.3	60-80
IGF2	Factor de crecimiento tipo insulina 2	11p15.5	70
MYOD1	Proteína de diferenciación miogénica 1	11p15.4	>90
N33	Candidato a supresor tumoral 3	8p22	80
PAX6	Caja emparejada 6	11p13	70
RAR $\beta$ 2	Receptor del ácido retinoico, beta	3p24	10-30
RASSF1A	Miembro 1 de la familia con dominio de asociación a Ras (RalGDS/AF6)	3p21.3	50
THBS2	Trombospondina 2	6q27	50
hMLH1	Homólogo mutL 1	3p21.3	10-20
p14ARF	Pauta de lectura alternativa p14	9p21	10-20
APC	Adenomatous poliposis coli	5q21-q22	10-20
CACNA1G	Subunidad alpha G1 del canal de calcio dependiente de voltaje de tipo T	17q22	10-20
HIC1	Hipermetilado en cáncer 1	17p13.3	50
LKB1	Serin/treonin quinasa 11	19p13.3	5-10
MDR1	Miembro 1 de la subfamilia B (MDR/TAP) con casete de unión a ATP	7q21.1	20-30
MGMT	O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa	10q26	30
p16INK4a	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 4a, p16	9p21	20-30
THBS1	Trombospondina 1	15q15	10-20
TIMP3	Inhibidor tisular de la metaloproteínasa 3	22q12.3	27

**Tabla 1.** Genes frecuentemente metilados en cáncer colorrectal.

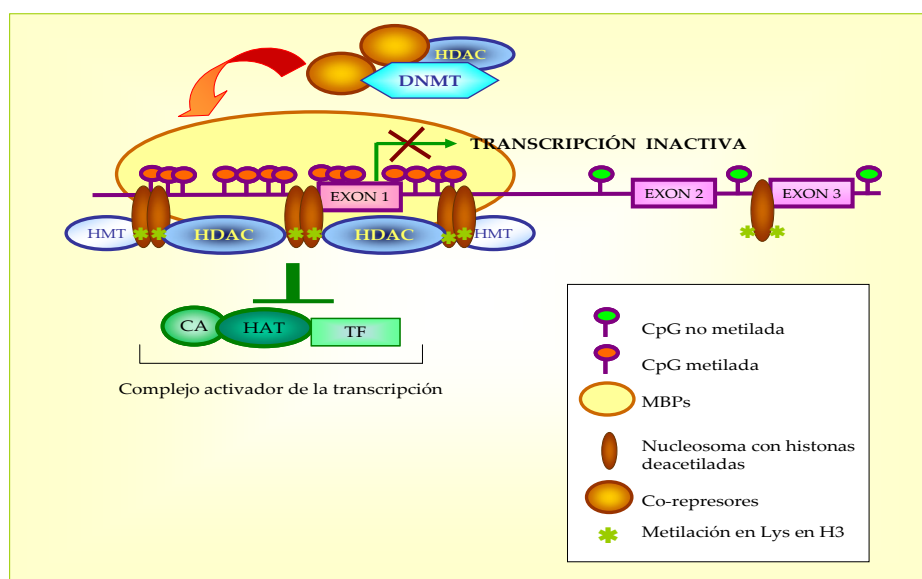
## 2.4 Epigenética del cáncer

La *epigenética* se define como los cambios hereditarios en la expresión de genes que no son debidos a alteraciones en la secuencia del ADN (Holliday, 1987). El marcador epigenético mejor conocido es la metilación del ADN.

En el genoma de mamíferos, sólo las bases citosina localizadas en la posición 5' de una guanósina, formando un dinucleótido CpG, son susceptibles de metilación. Estos dinucleótidos están muy poco representados a lo largo de todo el genoma, sin embargo, se encuentran concentrados en pequeñas regiones de 0,5-4 kb, denominadas islas CpG. La mayoría de las islas CpG se localizan en los promotores proximales de casi la mitad de los genes del genoma de mamíferos y, por lo general, se encuentran sin metilar en células normales (Jones & Baylin, 2002). La metilación de las islas CpG en las regiones promotoras se asocia con un silenciamiento de la transcripción del gen correspondiente, este evento

tiene lugar tanto fisiológicamente, para la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica, como en el desarrollo del cáncer (Jones & Baylin, 2002).

Las enzimas encargadas de transferir un grupo metilo procedente de la S-adenosilmetionina (SAM) a las citosinas de los dinucleótidos CpG del ADN, son las ADN metiltransferasas (DNMTs). Hasta la fecha, en mamíferos se han descrito cinco enzimas dentro de esta familia: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3l, las cuales presentan funciones distintas. DNMT1, se encarga de mantener el patrón de metilación en genes semi-metilados, copiando dicho patrón de la cadena de ADN parental a la hija durante la fase S del ciclo celular. DNMT3a y DNMT3b, poseen una función de metiltransferasas *de novo*, se encargan de metilar dinucleótidos CpG de una zona de doble cadena de ADN totalmente sin metilar (Jones & Baylin, 2002). Durante el proceso de metilación del ADN no sólo participan las DNMTs, sino que se produce la formación de complejos multiproteicos donde se encuentran proteínas como las histona deacetilasas (HDACs), las proteínas de unión a grupos metilo (MBP) e histona metiltransferasas (HMTs). En estos complejos, además de modificarse las islas CpG, también se produce la alteración de la estructura de las histonas, lo cual favorece a otras modificaciones epigenéticas, como la condensación de la cromatina (Jones & Baylin, 2002) (Figura 2).



**Figura 2. Modelo de silenciamiento epigenético.** DNMT: ADN metiltransferasa. HDAC: histona deacetilasa. HMT: histona metiltransferasa. CA: proteína co-activadora. HAT: histona acetiltransferasa. TF: Factor de transcripción. MBP: proteína de unión a grupos metilo. H3: Histona 3. (Modificado de Jones & Baylin, 2002).

En los últimos años se ha descubierto que la epigenética juega un papel crucial en el desarrollo y progresión del cáncer, hasta el punto de desarrollarse terapias epigenéticas en la lucha contra esta enfermedad. Las primeras alteraciones epigenéticas encontradas en tumores humanos fueron la hipometilación global del ADN (Feinberg & Vogelstein, 1983)

y la identificación de la hipermetilación de genes supresores (Merlo *et al.*, 1995). Recientemente, otros marcadores epigenéticos como son las modificaciones postraduccionales (acetilación, metilación) de histonas, también han adquirido importancia en el proceso de tumorigénesis humana (Esteller, 2008).

La hipometilación del ADN en tumores comparados con sus respectivos tejidos normales, se localiza en regiones correspondientes a áreas pobres en genes, como zonas estructurales (el ADN centromérico) y, normalmente, no se da en zonas de los promotores de genes. En CCR, aproximadamente una tercera parte de las regiones estudiadas, han perdido los grupos metilo que estaban presentes en el ADN de la mucosa colónica normal (Feinberg *et al.*, 1988).

Se han propuesto tres consecuencias moleculares de la hipometilación del ADN: inestabilidad cromosómica, reactivación de transposones y pérdida de la impronta (Esteller, 2008). En este sentido y centrando nuestra atención en el CCR, se ha descrito que la hipometilación del ADN promueve las lesiones pre-cancerosas tempranas en colon a través de deleciones genómicas (Yamada *et al.*, 2005) (Figura 1A). Además, la pérdida de la impronta del gen IGF2, es un factor de riesgo en CCR (Kaneda & Feinberg, 2005).

En cáncer, la hipermetilación de los promotores de genes es un evento muy común y está asociado con el silenciamiento transcripcional inapropiado de genes supresores tumorales (Figura 2). Sorprendentemente, es al menos tan común como la clásica interrupción por mutaciones. De acuerdo con el modelo de Knudson, según el cual es necesario silenciar ambos alelos de los genes supresores tumorales para observar una consecuencia fenotípica, se ha observado que cuando uno de los alelos se silencia por mutación o LOH, la otra copia, de forma muy frecuente, es desactivada por metilación del promotor (Burbee *et al.*, 2001; Knudson, 2000).

La hipermetilación de las islas CpG de promotores puede afectar a genes implicados en ciclo celular, reparación del ADN, metabolismo celular, interacciones célula-célula, apoptosis y angiogénesis, las cuales son funciones relacionadas con el desarrollo del cáncer (Herman & Baylin, 2003). Numerosos estudios de hipermetilación de promotores en tumores, desvelan que el perfil de metilación aberrante de genes oncosupresores es específico del tipo de cáncer, es decir, a cada tipo tumoral se le puede asignar un “hipermetiloma” del ADN específico y definido. En este sentido, se ha sugerido que existe una incidencia de 100 a 400 islas CpG hipermetiladas en las regiones promotoras de un tipo tumoral dado (Esteller *et al.*, 2001). En CCR, la metilación aberrante del ADN tiene lugar en estadios muy tempranos, en una mucosa aparentemente normal. También, se ha

observado que juega un papel fundamental en la formación y progresión del estadio de carcinoma debido al llamado “Fenotipo metilador de islas CpG” (CIMP), el cual es un evento que tiene lugar en el 50% de los casos de CCR esporádico (Toyota *et al.*, 1999). En la Tabla 1, se muestran los genes supresores tumorales más comunes silenciados por hipermetilación de sus promotores en CCR.

En los últimos años se ha descrito que existe una asociación entre la hipermetilación en las regiones promotoras de genes oncosupresores y una combinación particular de modificaciones postraduccionales de las histonas (Figura 2) (Esteller, 2008). En CCR, se han encontrado mutaciones en las proteínas modificadoras de histonas, EP300 y HDAC2 (Gayther *et al.*, 2000; Ropero *et al.*, 2006), y una disminución en las formas monoacetiladas y trimetiladas de la histona 4 (H4) (Fraga *et al.*, 2005).

Aún se desconoce el mecanismo por el cual se produce la hipermetilación de islas CpG de una forma específica en promotores de genes supresores tumorales, y de forma diferencial según el tipo tumoral. El descubrimiento de rutas de señalización implicadas en este tipo de regulación epigenética supondría un hallazgo novedoso e interesante para el desarrollo de terapias tumor-específicas y dirigidas contra un mecanismo tan general de la tumorigénesis como es la epigenética del cáncer.

## 2.5 La familia de las GTPasas Rho

La familia de GTPasas Rho de pequeño peso molecular engloba a un importante subgrupo dentro de la superfamilia de GTPasas Ras.

En mamíferos, la familia Rho comprende 20 miembros, que se dividen en ocho subfamilias a partir de su homología estructural y/o funcional: **Rho** (RhoA, RhoB, RhoC), **Rac** (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG), **Cdc42** (Cdc42, TC10, TCL), **RhoUV** (Chp y Wrch), **Rnd** (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE), **RhoBTB** (RhoBTB1 y RhoBTB2), **RhoDF** (RhoD y Rif), y **RhoH/TTF**. Asimismo, se han identificado variantes de corte y empalme alternativo de Rac1 y Cdc42. Aunque inicialmente se habían incluido en esta familia, recientemente, las proteínas RhoBTB3, Miro 1 y Miro 2, se han excluido de la misma debido a la ausencia del dominio inserto Rho que la caracteriza y a su origen filogenético distinto (Boureux *et al.*, 2007).

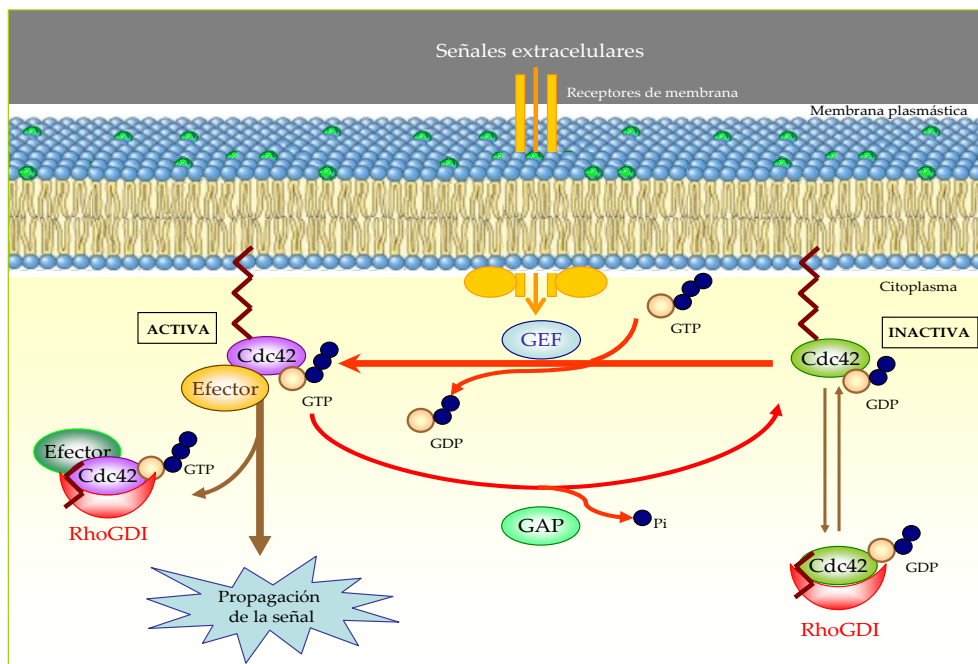
El dominio inserto Rho es el que diferencia a estas GTPasas de otras familias. Las proteínas Rho poseen 190-250 aminoácidos, y consisten únicamente en el dominio GTPasa y en pequeñas extensiones N-terminal y C-terminal, salvo en el caso de los miembros de las



subfamilia RhoBTB que difieren más debido a dominios estructurales adicionales (Wennerberg & Der, 2004).

Casi todos los miembros de la familia Rho sufren modificaciones postraduccionales por lípidos isoprenoides en su C-terminal. Esto facilita su apropiada localización subcelular y su asociación con membranas específicas, lo cual es crucial para su función. Normalmente, esta modificación consiste en una geranilgeranilación, aunque algunos miembros pueden ser farnesilados, palmitoilados o farnesilados y geranilgeranilados de forma simultánea (Armstrong *et al.*, 1995; Foster *et al.*, 1996; Michaelson *et al.*, 2001).

Como otros miembros de la superfamilia de GTPasas Ras, la mayoría de las proteínas Rho ciclan entre un estado activo, de unión a GTP y otro inactivo, de unión a GDP. Este ciclo está controlado por tres familias de proteínas distintas: los factores de intercambio de guanina (GEFs), proteínas de activación de la GTPasa (GAPs) e inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs). Hasta la fecha, se han identificado en mamíferos 70 RhoGEFs, 60 RhoGAPs y 3 RhoGDIs, reflejando el grado de complejidad de la regulación de este tipo de proteínas (Bos *et al.*, 2007; Dovas & Couchman, 2005) (Figura 3).



**Figura 3. Ciclo de activación de las GTPasas Rho:** Los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) activan a las GTPasas Rho al promover la liberación del GDP unido y la asociación con GTP. En su forma unida a GTP, las proteínas Rho son capaces de interactuar con diferentes efectores y activarlos para realizar sus funciones. Todas estas funciones están sujetas a una especificidad de estímulo (factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, etc.), además de estar reguladas por diversas integrinas y componentes de la matriz extracelular. Las proteínas de activación de la actividad GTPasa (GAPs) promueven la hidrólisis de GTP para pasar a la forma inactiva. Los inhibidores de la disociación de guanina (RhoGDIs) regulan la actividad de las GTPasas Rho mediante su unión al grupo prenilo en el C-terminal, previniendo su asociación a membranas y secuestrándolas en el citoplasma.

Tras la carga de GTP, se producen cambios conformacionales que permiten a las proteínas Rho interaccionar y activar a sus múltiples efectores que procesan la información y propagan la señal por la célula (Figura 3). Como consecuencia de su activación, las GTPasas Rho son capaces de estimular una gran variedad de procesos celulares. Los tres prototipos proteínas Rho más estudiados son RhoA, Rac1 y Cdc42. Su papel clave en la remodelación del citoesqueleto de actina, es su característica mejor estudiada. Este aspecto hace que estén implicadas en muchos procesos celulares, incluidos la morfología y polaridad celular, migración, adhesión, tráfico de vesículas y citocinesis (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Nobes & Hall, 1995a; Nobes & Hall, 1995b). Además, las GTPasas Rho controlan otras actividades celulares esenciales incluyendo, apoptosis, metabolismo lipídico, progresión en ciclo celular y regulación de la expresión génica. Por tanto, esta familia de proteínas juega un papel fundamental en procesos tales como la gastrulación, la diferenciación celular y la morfogénesis tisular durante el desarrollo embrionario; la curación de heridas, la reparación de tejidos, la respuesta inmune y la inflamación. En resumen, son las encargadas de transmitir diversas señales extracelulares hacia dianas específicas regulando una gran variedad de actividades celulares esenciales (Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997).

Así como las proteínas Rho tienen una contribución clave en múltiples procesos fisiológicos, también se ha demostrado que juegan un papel esencial en la biología tumoral y en otras patologías humanas (Boettner & Van Aelst, 2002).

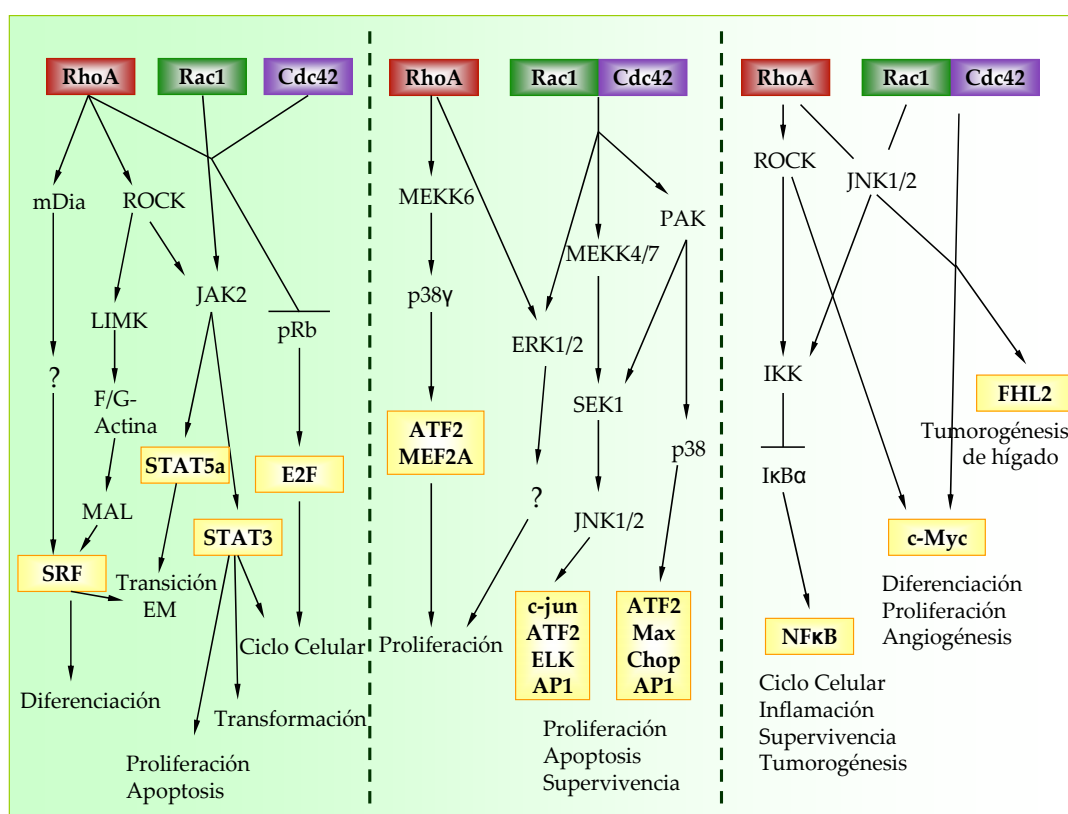
## **2.6 Las GTPasas Rho en cáncer humano**

El estudio de diversas proteínas Rho en tumores humanos reveló que, al contrario que la proteína Ras, las GTPasas Rho no presentan mutaciones en tumores; sino que se encuentran, de forma muy frecuente, sobreexpresadas, y en menor medida sobre-activadas. Por ejemplo, RhoA, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42, Rnd1, RhoG y RhoF se han encontrado sobreexpresadas en diversos tumores humanos (Gomez del Pulgar *et al.*, 2005; Gouw *et al.*, 2005; Vega & Ridley, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que otros miembros de esta familia actúan como genes supresores tumorales, como son RhoB y RhoBTB, y se encuentran deleccionados, mutados o silenciados en algunos tipos tumorales (Berthold *et al.*, 2008; Huang & Prendergast, 2006).

Las GTPasas Rho están implicadas en múltiples procesos celulares que se asocian con la mayoría de los pasos de iniciación y progresión del cáncer, incluidos la adquisición del

potencial ilimitado de proliferación, supervivencia, evasión de la apoptosis, invasión tisular y establecimiento de la metástasis (Vega & Ridley, 2008).

Algunos de los miembros Rho se piensa que son capaces de regular la liberación de factores pro-angiogénicos para promover la neovascularización y así permitir un mayor crecimiento tumoral (Merajver & Usmani, 2005). Asimismo, debido a su papel en el dinamismo del citoesqueleto, se ha demostrado que algunos miembros son cruciales en los pasos de pérdida de contacto célula-célula y en los diferentes tipos de migración celular para llevar a cabo la invasión, como son los movimientos ameboides, mesenquimales o movimientos de migración colectivos (Vega & Ridley, 2008). Además, las proteínas Rho son capaces de estimular la progresión en el ciclo celular (Coleman *et al.*, 2004; Narumiya & Yasuda, 2006) y de regular la transcripción génica (Aznar *et al.*, 2001) (Benitah *et al.*, 2004) (Figura 4).



**Figura 4. Regulación de factores de transcripción mediada por RhoA, Rac1 y Cdc42.** Transición EM= Transición Epitelio-Mesénquima. Figura adaptada de Benitah y col., 2004.

Hasta hace pocos años, el conocimiento de la relación entre la regulación de la transcripción génica mediada por Rho y la consecuente función celular era muy escaso. Recientemente, ha adquirido una gran importancia debido a que muchos de los papeles que desempeñan las proteínas Rho en tumorigénesis están asociados con mecanismos de

señalización que desembocan en una regulación transcripcional (Benitah *et al.*, 2004; Berenjeno *et al.*, 2007) (Figura 4).

Las GTPasas Rho modulan la actividad de una gran variedad de factores de transcripción, tales como SRF, NF $\kappa$ B, c/EBP $\beta$ , Stat3, Stat5, FHL-2, PAX6, GATA-4, E2F, Receptor de Estrógeno  $\alpha/\beta$ , CREB, y de forma indirecta también modulan a los factores de transcripción que dependen de la señalización de las quinasas JNK y p38. Entre los sustratos de estas quinasas se incluyen c-Jun, ELK, PEA3, ATF2, MEF2A, Max y CHOP/2GADD153. A muchos de estos factores de transcripción ya se les ha asociado con una función celular específica relacionada con la tumorigénesis (Benitah *et al.*, 2003; Benitah *et al.*, 2004) (Figura 4).

En conclusión, debido al amplio espectro de funciones clave que desempeñan las GTPasas Rho tanto a nivel fisiológico, como en el contexto de la biología tumoral, se hace muy complejo entender cómo trabajan estas proteínas en la célula y de qué forma específica contribuyen a la carcinogénesis de un tipo tumoral concreto. Por tanto, se hace necesario estudiar tanto la relevancia de cada uno de los miembros en los distintos tipos tumorales, como su mecanismo de acción a la hora de contribuir a la transformación y progresión tumoral. Con esta información, se abrirían las puertas hacia el desarrollo de terapias antitumorales altamente específicas y relevantes en la lucha contra el cáncer.

## 2.7 Implicación de Cdc42 en tumorigénesis

### 2.7.1 Generalidades

Como ya se ha indicado, Cdc42 es uno de los miembros de la familia Rho mejor estudiados. En cuanto a las funciones celulares que desempeña, destacan, su papel en la organización del citoesqueleto de actina y la polaridad celular. En este sentido, Cdc42 induce la formación de filopodios, los cuales pueden estar involucrados en el reconocimiento del entorno extracelular, en la determinación de la polaridad celular y en los contactos célula-célula (Gupton & Gertler, 2007).

Desde el punto de vista fisiológico, Cdc42 se ha implicado en diversas funciones celulares como son el crecimiento y mielinización axonal, migración y quimiotaxis, la polaridad celular, el tráfico vesicular, regulación del ciclo celular y la determinación del linaje celular (Heasman & Ridley, 2008). En distintos tipos celulares, como son macrófagos, células T y fibroblastos, se ha visto que tanto *in vivo* como *in vitro*, Cdc42 es fundamental para los procesos de quimiotaxis y migración dirigida. En fibroblastos embrionarios

murinos (MEFs) y en células madre hematopoyéticas deficientes en Cdc42, se ha encontrado que esta GTPasa Rho es esencial en quimiotaxis (Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006b). Por el contrario, la migración dirigida en fibroblastos con carencia de Cdc42 no estaba afectada (Czuchra *et al.*, 2005). En células madre hematopoyéticas, la pérdida de Cdc42 afecta profundamente a la diferenciación y a la progresión en ciclo celular, ambos procesos pueden afectar indirectamente a la capacidad migratoria de las células (Yang *et al.*, 2007). Esto indica que la contribución de Cdc42 depende del tipo celular.

El análisis de ratones Knock Out (KO) condicionales para Cdc42, revela que la regulación de la polaridad por Cdc42 *in vivo* es clave para la determinación del linaje celular tras la división celular. Por ejemplo, para el caso de ratones KO de Cdc42 condicionales restringidos a la epidermis, la pérdida de Cdc42 produce la diferenciación de queratinocitos epidérmicos en lugar de células del folículo del pelo, y se cree que es debido al papel que juega Cdc42 en la degradación de  $\beta$ -catenina por la vía PKC (Wu *et al.*, 2006).

### 2.7.2 Papel en cáncer

La implicación de Cdc42 en el proceso carcinogénico se ha asociado con su expresión aberrante y con un incremento en su actividad. En este sentido, estudios por inmunodetección han demostrado que la proteína Cdc42 se encuentra altamente expresada en muestras de tumores de mama comparadas con su correspondiente tejido normal (Fritz *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 1999). Esta evidencia se vio reforzada con el modelo murino de carcinogénesis de mama, donde el mutante dominante negativo de Cdc42 reducía tanto el número de contactos focales como la formación de colonias en agar semisólido *in vitro* y afectaba al crecimiento celular *in vivo*. Esta forma inactiva de Cdc42 reduce la intravasación hacia la sangre periférica y la metástasis a pulmón (Bouzahzah *et al.*, 2001). Asimismo, Cdc42 se encuentra significativamente sobreexpresada en muestras tumorales de pacientes con cáncer testicular, y además, dichos niveles se asocian con la progresión tumoral (Kamai *et al.*, 2004). Por otra parte, el análisis por inmunohistoquímica de los niveles de proteína de Cdc42 en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, reveló que Cdc42 presenta unos niveles más elevados comparados con el correspondiente tejido normal (Abraham *et al.*, 2001). Igualmente, se ha detectado una sobreactivación de Cdc42 por antígenos de superficie en células de melanoma. Dicha activación se ha asociado con señales de crecimiento, invasión celular y angiogénesis (Eisenmann *et al.*, 1999; Gadea *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2002). En este tipo tumoral también se ha observado una sobreexpresión de la

proteína Cdc42 en muestras de pacientes mediante ensayos de inmunohistoquímica, dicha sobreexpresión se asociaba con un peor pronóstico (Tucci *et al.*, 2007).

Sin embargo, se ha sugerido que la contribución de Cdc42 en la progresión tumoral es específica del tipo de tejido, ya que en ratones KO de Cdc42 condicionales para hígado, la probabilidad de desarrollo de cáncer de hígado se ve aumentada (van Hengel *et al.*, 2008). En este contexto, la sobreexpresión de la forma activa de Cdc42 en células Jurkat, promueve un incremento de los niveles de ceramidas dando lugar a la muerte celular (Chuang *et al.*, 1997).

A la hora de estudiar los mecanismos por los cuales Cdc42 participa en el proceso de transformación, se ha observado que lo hace a través de sus funciones en tráfico vesicular, regulación del ciclo celular, migración y regulación transcripcional (Vega & Ridley, 2008). Sin embargo, estas funciones celulares se ven limitadas a un tipo tumoral y contexto celular concreto.

Existe un gran número de evidencias donde se afirma que Cdc42 juega un papel importante en el tráfico intracelular (Cerione, 2004). En células de mamíferos, Cdc42 se localiza, de forma predominante, en el complejo de Golgi. En este compartimento subcelular, la forma activa de Cdc42 es capaz de unirse al complejo COPI (Erickson *et al.*, 1996). Este complejo tiene un papel clave en el tráfico vesicular ya que se encarga de cubrir las vesículas derivadas del tráfico al Golgi. Este papel, se ha asociado con la regulación en el crecimiento celular ya que Cdc42 es capaz de regular el tráfico intracelular y procesamiento del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). La sobreexpresión de una forma mutante de Cdc42 que la mantiene unida de forma constitutiva a GTP (Cdc42F28L) produce una acumulación del receptor EGF en la célula causando una señal mitogénica permanentemente activada a través de la ruta de señalización Ras-Erk que lleva a la transformación celular (Wu *et al.*, 2003). En este contexto, se ha demostrado que en fibroblastos de ratón, Cdc42 estimula y contribuye en la transformación mediada por Ras *in vitro* (Qiu *et al.*, 1997).

Cdc42 es importante en la progresión en el ciclo celular a través de su implicación en el paso de la fase G1 a la fase S (Olson *et al.*, 1995), pero sobre todo, por su papel durante el proceso de mitosis (Yasuda *et al.*, 2006). Este miembro de la familia de GTPasas Rho es clave para la segregación cromosómica, debido a su papel durante el acoplamiento del cinetocoro, a través de su efector mDia3 en la prometáfase, y a su papel durante la separación del huso acromático, a través de su efector Par6 durante la metafase (Jaffe &

Hall, 2005). La inhibición de Cdc42 causa parada mitótica en la cual muchos cromosomas no están debidamente unidos a los microtúbulos (Yasuda *et al.*, 2004).

En cuanto al papel de Cdc42 en polaridad celular, se ha demostrado que Cdc42 es relevante en la migración mesenquimal de células aisladas, contribuyendo a la invasión celular *in vitro*. Sin embargo, no parece que participe en la migración de morfología ameboide (Friedl & Wolf, 2003). También es importante en el proceso de invasión por migración celular colectiva (Gaggioli *et al.*, 2007).

La implicación de Cdc42 en el control de la transcripción génica también se ha propuesto recientemente como un mecanismo de participación en la progresión tumoral (Figura 4) (Benitah *et al.*, 2004). Cdc42, a través de una vía dependiente de la señalización JNK, es capaz de activar la ruta NFκB (Montaner *et al.*, 1998; Perona *et al.*, 1997). Uno de los genes diana que traducen a una proteína implicada en inflamación y cáncer es COX-2. En consonancia, en células epiteliales humanas RhoA, Rac1 y Cdc42 promueven la expresión transcripcional de COX-2 a través de un mecanismo dependiente de NFκB (Benitah *et al.*, 2003). Las GTPasas Rho también se valen del factor de transcripción STAT3 para llevar a cabo el proceso de transformación (Figura 4) (Aznar *et al.*, 2001). El silenciamiento de Cdc42 por siRNA en dos líneas derivadas de cáncer de vejiga disminuía los niveles de fosforilación del factor de transcripción STAT3 dando lugar a una inhibición de la proliferación celular y una inducción de la apoptosis (Wu *et al.*, 2008).

El papel de Cdc42 en cáncer es tejido-dependiente, por tanto es preciso conocer su papel específico en cada tipo tumoral tanto a nivel de su grado de expresión, como a nivel de los mecanismos de señalización implicados en la transformación regulada por Cdc42.





## **OBJETIVOS**



### 3 Objetivos

Los objetivos de este estudio se fijaron en base a la hipótesis de que la GTPasa Cdc42 es un factor relevante para el desarrollo de tumores colorrectales en humanos y que ejerce esta función biológica a través de la alteración de los procesos normales de regulación transcripcional. En concreto se fijaron los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación del papel de Cdc42 en el desarrollo del cáncer colorrectal en humanos mediante el estudio de los niveles de expresión de esta GTPasa en muestras de pacientes: relevancia clínica.
- Generación de un modelo celular humano *in vitro* donde se modulasen, de forma estable, los niveles de Cdc42 para el posterior estudio del papel de esta GTPasa en CCR.
- Identificación de nuevas dianas transcripcionales reguladas por Cdc42 relevantes en la tumorigénesis colorrectal complementarias a las ya descritas.
- Estudio de los mecanismos de regulación transcripcional dependientes de Cdc42 de los nuevos genes identificados y validados.
- Evaluación de la capacidad oncogénica de Cdc42 *in vivo* en células humanas utilizando xenotrasplantes en modelos murinos.
- Relevancia de los genes identificados y su asociación con Cdc42 en cáncer colorrectal: posibles aplicaciones clínicas.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 4 Materiales y Métodos

### 4.1 Muestras de pacientes

En este estudio se incluyeron un total de 57 muestras de tejido tumoral colorrectal y sus correspondientes muestras de tejido normal adyacente procedente de pacientes que se sometieron a cirugía en el Hospital Universitario de la Paz de Madrid, entre los años 2003 y 2006. Ninguno de los pacientes recibió terapia neoadyuvante. Todas las muestras fueron recogidas en el momento de la operación e inmediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El Departamento de Patología del Hospital Universitario de La Paz examinó y determinó el estadio a nivel local de las muestras de acuerdo con los criterios establecidos por la AJCC y la UICC. Los parámetros analizados fueron el grado de penetración del tumor a través de la pared intestinal (T) y el grado de invasión de células tumorales en los nódulos linfáticos regionales (N). Sin embargo, no fue posible disponer de la información sobre la diseminación de la enfermedad (M). El grado histológico de los tejidos tumorales examinados también fue determinado. La información sobre el seguimiento de los pacientes se vio limitada debido a que la mayoría de las cirugías se habían realizado hace menos de 5 años.

### 4.2 Extracción de proteína total procedente de tejidos humanos y de ratón

Para la extracción de proteína total procedente de tejidos humanos, se partió de 20 cortes de 10 micras por pieza congelada. Dichos cortes de tejido se homogeneizaron y se trataron con una solución detergente compuesta por:  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, EDTA 0,2 mM, NaCl 0,3 M, HEPES 25 mM pH 7,5,  $\beta$ -glicerofosfato 20 mM y Tritón X-100 0,1% (v/v); y conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas: fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, pepstatina A 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , leupeptina 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de aprotinina y  $\text{Na}_3\text{V}_2\text{O}_4$  0,1 mM (todos procedentes de Sigma Chemical Co.). Con la finalidad de degradar los ácidos nucleicos existentes, a esta mezcla se le añadió 1  $\mu\text{l}$  (378 U) de la endonucleasa Benzonasa (Sigma Chemical Co.). Para la extracción de proteína total de muestras de tumor procedentes de autopsias de ratones, se partieron de 30-50 mg de dicho tejido congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se homogenizaron con un mortero y se trataron con la misma solución de lisis.

Los núcleos y el material insoluble fueron eliminados por centrifugación a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los extractos se sometieron a agitación rotatoria durante 1h a temperatura ambiente para dejar actuar a la Benzonasa. Para eliminar finalmente los restos lipídicos, se centrifugaron los extractos proteicos a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. La concentración de proteína total se determinó por el método Bradford (Bio-Rad Hercules, CA) utilizando como patrón concentraciones crecientes de BSA (seroalbúmina bovina) (Sigma Chemical Co).

#### **4.3 Extracción de proteína total procedente de líneas celulares**

Las células se lavaron 2 veces con el tampón fosfato salino (PBS). Los extractos proteicos totales se obtuvieron a partir de una solución de lisis: NaF 50 mM,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  10 mM, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tritón X-100 0.5% (v/v), deoxicolato sódico 0,5% (p/v), conteniendo los inhibidores de proteasas y fosfatasas 0,4 mM de PMSF, 2 µg/ml de pepstatina A, 2 µg/ml de leupeptina, 1 mM de DTT, 2 µg/ml de aprotinina y 0,2 mM de  $\text{Na}_3\text{V}_2\text{O}_4$  (todos procedentes de Sigma Chemical Co.). El contenido de proteína total se evaluó por el método Bradford mencionado anteriormente.

#### **4.4 Separación electroforética de proteínas procedentes de tejidos o de líneas celulares e Inmunodetección (Western Blot)**

Para el análisis de expresión de proteínas específicas se resolvieron 20 µg de extracto de proteína total procedente tanto de tejidos, humanos o de ratón, como de líneas celulares, en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras de SDS (PAGE-SDS) (Bio-Rad Hercules, CA). A continuación se transfirieron a una membrana de Immobilon-P PVDF (Millipore). Las membranas bloqueadas en 5% de leche en polvo desnatada en T-TBS (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%) se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente o 15 horas a 4°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo conjugados directamente con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a temperatura ambiente. La visualización de las proteínas se realizó mediante el método de quimioluminiscencia ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences) siguiendo las indicaciones del fabricante.



Los anticuerpos primarios utilizados fueron los anticuerpos monoclonales frente a Cdc42 (BD Transduction Laboratories), tubulina (Sigma Chemical Co) y GAPDH (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA); y los anticuerpos policlonales frente a p16 y Twist (ambos de Santa Cruz Biotechnology), y se incubaron según las especificaciones de las casas comerciales.

Para la cuantificación de proteína se utilizó el programa ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los niveles de proteína se normalizaron según la intensidad del control de carga utilizado en cada caso, tubulina o GAPDH.

#### 4.5 Cultivos celulares y reactivos

En este trabajo se utilizaron líneas celulares derivadas de adenocarcinomas colorrectales humanos: COLO 201, HCT116, HT29, LoVo, RKO SW480, SW620, T84 y WiDr, y la línea celular CCD-18Co, derivada de tejido normal de colon. Todas ellas procedían de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Los medios de cultivo utilizados fueron DMEM (Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco) (Gibco) para las líneas CCD-18Co, HT-29, SW480, SW620; EMEM (Medio Esencial Mínimo *Eagle*) (Gibco) para WiDr; RPMI (Instituto Memorial *Roswell Park*) (Gibco) para COLO 201; F12K (Medio de cultivo F-12 de Ham modificado por Kaighn) (Gibco) para LoVo y McCoy's 5A (ATCC) para HCT116. Todos estos medios fueron suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), 2 mM de glutamina, 0,5 µg/ml de fungizona y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (todos estos reactivos procedentes de Gibco). Las líneas celulares fueron mantenidas en condiciones de cultivo estándar de 95% de humedad, 37°C de temperatura y 5% CO<sub>2</sub>.

Para ensayos de reexpresión de genes regulados epigenéticamente, las células fueron tratados con el inhibidor de las DNMTs 5-Azacidina (Sigma Chemical Co.). Para su preparación, se diluyó en PBS (pH 7,4) quedando a una concentración de 1 mg/ml. Se sembraron 7x10<sup>5</sup> células SW620 en Flask T-75 (BD Falcon) y se trataron con este inhibidor a una concentración final de 5 µg/ml durante 3 días. Se realizó el mismo procedimiento para las células control a las cuales se les añadió PBS (pH 7,4) en lugar de 5-Azacidina. Debido a la inestabilidad del compuesto, se realizaron cambios de medio a las células diariamente y se añadió el inhibidor fresco a la misma concentración final indicada.

## 4.6 Vectores de expresión y transfecciones

La construcción de pcDNA3B-neo que dirige la expresión de la proteína Cdc42 salvaje humana (Cdc42wt) y le confiere resistencia al antibiótico neomicina ha sido previamente descrita (Aznar *et al.*, 2001).

La horquilla de ARN de interferencia (shARN) frente al gen CDC42 humano (Cdc42i) fue diseñada de acuerdo con las pautas descritas por Agami y colaboradores (Brummelkamp *et al.*, 2002). Para ello, se desarrollaron dos oligonucleótidos complementarios de 64 pares de bases (pb) de las cuales 19 interferían con la secuencia del gen CDC42 humano. Para este diseño se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones: la secuencia de 19 nucleótidos seleccionada dentro del correspondiente ADN codificante del gen debía estar flanqueada por AA en el extremo 5' y TT en el extremo 3' de su ARN mensajero. Además, debía contener más de un 30% de G y C; estar localizada aproximadamente a 100 pares de bases del comienzo de su ADN codificante y no tener seguidas cuatro o más A o T. Adicionalmente, el par de oligonucleótidos fue diseñado para producir dos lugares de restricción protuberante *Bgl II* en el extremo 5' y *Hind III* en el extremo 3'.

La secuencia candidata se comparó en el programa BLAST con la secuencia completa del genoma humano para asegurar que sólo se estaba interfiriendo con el gen humano CDC42. Los oligonucleótidos se hibridaron y clonaron en el sitio de restricción *Bgl II* en el extremo 5' y *Hind III* en el extremo 3' del vector pSUPER-neo (OligoEngine).

El cebador de la hebra de ADN directa diseñado fue:

5'-ATCCCCCTATGCAGTCACAGTTATGTTCAAGAGACATAACTGTGACT  
GCATAGTTT'TTGAAA-3'

Y el cebador de la hebra de ADN complementaria:

5'-GCTTTTCCAAAACTATGCAGTCACAGTTATGTCTCTTGAACATAAC  
TGTGACTGCATAGGGG-3'

Los caracteres subrayados indican las secuencias sentido y antisentido del ARNm diana y los que están en negrita se refieren a los 9 pb correspondientes al bucle de la horquilla o espaciador y a los lugares de restricción protuberantes.

Los vectores vacíos pCDNA3b y pSUPER-neo fueron usados como control obteniéndose similares resultados en todos los casos.

#### 4.6.1 *Transfecciones estables*

Para la transfección estable, se sembraron  $3,5 \times 10^5$  células SW620 en placas de 6 pocillos quedando a un 60-70% de confluencia. Transcurridas 48 horas después de sembrar las células se realizaron las transfecciones usando el reactivo lipídico Lipofectamina Plus (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de ADN plasmídico (Cdc42wt o Cdc42i) se mantuvo constante a 5  $\mu\text{g}$  por pocillo. A las 24 horas posteriores a la transfección, se cambió el medio a las células por uno con selección, 2,5 mg/ml de neomicina (Sigma Chemical Co.), y se mantuvo durante 12 días para aislar clones celulares. Transcurridos estos 12 días se observaron colonias celulares aisladas, cada una de las cuales provenía de una sola célula resistente a la neomicina debido a que portan el ADN plasmídico transfectado. En este estado inicial de crecimiento, de sólo unas cuantas células por colonia, se procedió a aislar cada colonia usando aros estériles de poliestireno (aros de clonación), los cuales fueron sumergidos en grasa estéril y colocados en cada colonia individual. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de tripsina (Gibco) por aro para despegar cada grupo de células de la placa. Se recogieron de dentro del aro las células clonadas y se transfirieron a placas de 24 pocillos para su crecimiento y amplificación. Para validar estos clones se comprobaron los niveles de expresión de Cdc42 mediante ensayos de inmunodetección. Como resultado, se obtuvieron una serie de clones que sobreexpresaban la forma salvaje de Cdc42 (Cdc42wt), y otra serie de clones cuyos niveles de Cdc42 se veían reducidos (Cdc42i) con respecto a la línea parental SW620.

#### 4.6.2 *Transfecciones transitorias*

Para las transfecciones transitorias se procedió de la misma manera que en las transfecciones estables tanto a la hora de sembrar las células como en el protocolo de transfección. La cantidad de ADN plasmídico (Cdc42wt o vector vacío) fue de 2  $\mu\text{g}$  por pocillo. Las células fueron recogidas a las 48 horas después de ser transfectadas.

### 4.7 **Extracción de ARN total procedente de líneas celulares y de tejidos humanos**

Para la extracción del ARN total de las distintas líneas celulares se partió de  $5 \times 10^6$  células y se extrajo con el kit RNeasy Mini (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el caso de las muestras clínicas, se partió de 20 cortes de 10 micras por

pieza y se realizó un paso previo al kit RNeasy Mini (Qiagen) para la lisis celular y separación de macromoléculas utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN se visualizó en un gel de agarosa al 1% y su integridad, así como su cuantificación, se llevó a cabo en el espectrofotómetro Nanodrop ND 1000.

## **4.8 Análisis del perfil de expresión génica diferencial por microarrays de ADNc**

Se analizaron los cambios del perfil de expresión génica producidos por la modulación genética de los niveles de Cdc42 en la línea SW620 usando la tecnología de microarrays de oligonucleótidos de alta densidad (Gomez del Pulgar *et al.*, 2007).

### *4.8.1 Diseño de la plataforma de array*

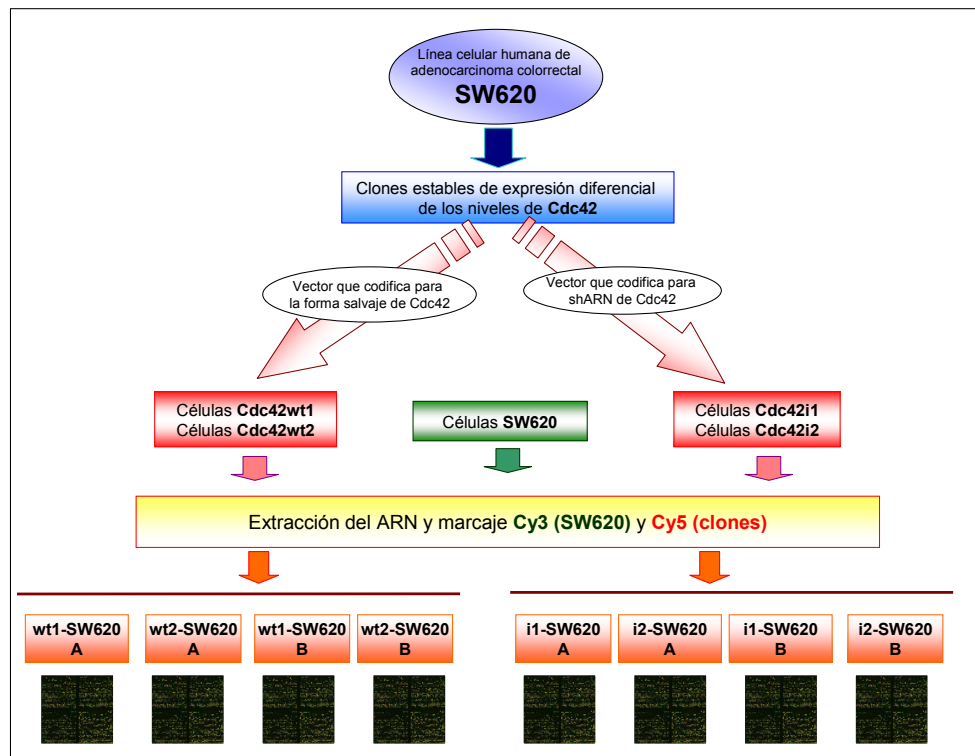
Los experimentos de microarrays se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Jesús García Foncillas (Clínica Universitaria de Navarra). Los microarrays usados en este estudio se adquirieron de la Institución de ADN Microarrays del Centro de Genómica Aplicada (CAG) (<http://www.cag.icph.org/>), centro multidisciplinar perteneciente a la Universidad de Medicina y Odontología (UMDNJ), a la Escuela de Medicina (NJMS) y el Instituto de Tecnología de New Jersey (NJIT).

En concreto, la plataforma de microarrays usada se denomina Human 19k Oligo Array, la cual contiene aproximadamente 19000 oligonucleótidos. Las sondas procedían de la colección Compugen y fueron punteados, de forma muy precisa, sobre unos portaobjetos de poli-L-Lisina que contenían una solución genómica con el aparato GeneMachines OmniGrid Microarrayers. El diseño del array incluye 48 subarrays colocados en 12 filas por 4 columnas y cada subarray se compone a su vez de 20 filas por 20 columnas. Como control de calidad de la plataforma y del proceso experimental, cada portaobjetos contenía 339 puntos vacíos como control negativo.

### *4.8.2 Descripción del diseño experimental*

Se partió de la línea celular de carcinoma colorrectal humano, SW620 modificada genéticamente para expresar niveles diferenciales de Cdc42. Por un lado, se generaron clones estables que sobreexpresaban la forma salvaje de Cdc42 (Cdc42wt), y por el otro se

obtuvieron transfectantes estables que tenían disminuidos los niveles de Cdc42 (Cdc42i), como se ha detallado anteriormente. Para este experimento de arrays, de cada tipo de modificación se realizaron dos réplicas biológicas, es decir, se contó con dos clones de sobreexpresión (wt1 y wt2) y dos de interferencia (i1 e i2); y se usó como referencia la línea parental SW620. Además, de cada una de las muestras se hizo una réplica experimental, contando finalmente con ocho microarrays (Figura5).



**Figura 5. Diseño del experimento de microarrays.** Partiendo de la línea SW620 se generaron clones de sobreexpresión (Cdc42wt) e interferencia de Cdc42 (Cdc42i). Se escogieron dos clones de cada grupo, de sobreexpresión, Cdc42wt1 y wt2 y de interferencia, Cdc42i1 e i2, y su ARN fue marcado con Cy5 (color rojo). El ARN de SW620 se marcó con Cy3 (verde) estableciéndose como la muestra de referencia para todos los casos. Se realizaron en total 8 microarrays ya que adicionalmente se realizaron réplicas experimentales (A y B).

En cada hibridación el ARN de referencia (SW620) siempre fue marcado con Cy3/Alexa 546 (de color verde) y se comparó con cada una de las muestras modificadas con los niveles de Cdc42, marcadas siempre con Cy5/Alexa 647 (de color rojo). Este método permite comparar la expresión de un gen en las diferentes muestras, procedentes de experimentos independientes, ya que el resultado que se obtiene es la medida relativa de expresión de ese gen respecto a la referencia interna, en cada uno de los microarrays en ese mismo punto (Dobbin *et al.*, 2003).

#### 4.8.3 *Marcaje e hibridación de las muestras*

Se retro-transcribieron 2 µg del ARN total de cada una de las réplicas a su ADN complementario usando cebadores de transcripción reversa. Este ARN se marcó con 2 µl del agente de captura, Cy3 o Cy5, según el tipo de muestra. Para ello se utilizó el kit 3DNA Submicro Oligo Expression Array Detection (Genisphere, Hatfield, PA). Para cada hibridación se prepararon dos sondas por separado: una marcada con Cy3 (SW620) y otra con Cy5 (clones).

Los portaobjetos del microarray se hidrataron, se secaron en una placa caliente y se introdujeron en el UV Crosslinker (2 veces a 600 µJ/cm<sup>2</sup>). Después, se prehibridaron con una solución tampón que contenía SSC 5x (cloruro sódico 750 mM y citrato sódico 75 mM, pH 7,0), formamida 25% y SDS 0,1%, a 45°C durante 1 hora y se lavaron en isopropanol, después en agua destilada y se secaron con aire comprimido. Seguidamente, se añadió la mezcla de hibridación a los microarrays prehibridados, se cubrieron con un cubreobjetos y se mantuvieron en cámaras húmedas en un baño a 50°C durante 18 horas aproximadamente.

Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados consecutivamente durante 10 minutos en las diferentes soluciones tampón: SSC 2x/SDS 0,2% a 42°C, SSC 2x/SDS 0,2% a temperatura ambiente y SSC 0,2x a temperatura ambiente. Para, a continuación, ser lavados con agua destilada durante 5 segundos y secados con aire comprimido.

#### 4.8.4 *Detección y cuantificación de la señal*

Para el análisis de las muestras hibridadas sobre los microarrays se utilizó el escáner Affymetrix GMS 418 (Affymetrix Santa Clara, CA) y se obtuvieron imágenes para cada uno de los canales de fluorescencia Cy3 y Cy5.

Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarray, se requiere el procesamiento de las imágenes. Para ello se utilizó el software Imagen 4.1, con el que se realizó la superposición y el tratamiento de las mismas para depurar la imagen de imperfecciones o señales no deseadas, y así medir la intensidad de fluorescencia. El programa calcula la densidad de los píxeles en cada área definida, dando como resultado una tabla con los valores de señal y fondo para cada uno de los microarrays.

#### 4.8.5 Procesamiento de datos y análisis estadístico

Para el análisis de los datos se empleó el programa BRB Arraytools (<http://linus.nci.nih.gov/BRBArrayTools.html>) desarrollado por *Biometric Research Branch of the National Cancer Institute*, el cual está diseñado para la visualización y el análisis estadístico de los datos de microarrays.

Dentro de este programa se usó el método de análisis de Comparación de Clases (*Class Comparison*) el cual permite diferenciar si el patrón de expresión génica, para los niveles significativos, es diferente entre dos grupos predeterminados y, a su vez, identificar los genes responsables de tales diferencias. Para ello, en primer lugar, se hizo un ajuste de fluorescencia restando la fluorescencia inicial de cada canal, de la fluorescencia debida al fondo del microarray. A continuación, se calculó el ratio entre los valores de fluorescencia de los datos del canal Cy5 (los datos de las muestras Cdc42wt o Cdc42i) frente a los valores de fluorescencia de la referencia del canal Cy3 (SW620). Seguidamente, se hizo un primer filtrado por el mínimo de intensidad fluorescente aceptada y se aplicó un filtro por el cual sólo los puntos con un valor de calidad predeterminado (igual a 0, en nuestro caso) fueran incluidos en el análisis. Se transformaron los datos a escala logarítmica en base 2 ( $\text{Log}_2\text{Cy5}/\text{Log}_2\text{Cy3}$ ). Cada microarray fue normalizado usando un criterio dependiente de la intensidad de señal fluorescente (usamos una función no lineal llamada “Lowess Smoother”). A continuación, se establecieron criterios de diferenciación de niveles de expresión según clases predeterminadas (muestras de sobreexpresión de Cdc42, wt, frente a muestras de interferencia de Cdc42, i). El análisis estadístico se llevó a cabo aplicando el *t*-test a los datos de las correspondientes clases y considerando como estadísticamente significativos los genes para los que el parámetro *p-value* (valor p) era menor de 0,05.

Por último, el filtrado de genes se hizo en base al mínimo cambio en veces de expresión requerido para cada gen, que se fijaron en 1,5, ya se tratara tanto de inducción como de represión de genes por el grupo de sobreexpresión de Cdc42 (Cdc42wt) frente al grupo de interferencia de Cdc42 (Cdc42i). De esta manera, se eliminaban los genes que menos información aportaban y se identificaban los genes responsables de las diferencias biológicas que dependían de la presencia de Cdc42.

Para investigar el significado biológico de los genes candidatos, se completó la información obtenida anteriormente con las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) en donde se indica el nombre del gen, su función biológica, la ruta molecular a la que pertenece, su localización subcelular,

etc. Complementariamente, se utilizó el programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, *Ingenuity Systems*, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). Este programa integra en redes la lista de genes seleccionados en función de las relaciones biológicas más significativas, de acuerdo con la bibliografía publicada.

#### 4.9 RT-PCR semicuantitativa

Uno de los métodos utilizados para la validación de la expresión diferencial de los genes fue la técnica de RT-PCR semicuantitativa.

Dos µg ARN total extraído de los clones de expresión diferencial de Cdc42 (Cdc42wt y Cdc42i) se retro-transcribieron a ADNc usando la enzima transcriptasa reversa AMV (Promega), siguiendo el protocolo que indicaba el fabricante. A continuación, para la amplificación de los fragmentos específicos por PCR, se usaron como molde 2 µl de una dilución 1:5 del ADNc. Las condiciones generales de la reacción fueron: una concentración final de los pares de oligos de 400 nM, para el caso de ID4, 750 nM para CACNA2D2 y PDGB, y de 1 µM para GAPDH y KIAA1456; 1,5 U de ADN polimerasa (Biotools) por reacción y 35 ciclos de amplificación. Las condiciones específicas de cada PCR se detallan en la Tabla 2. Para todos los casos, excepto GAPDH, la secuencia de los cebadores usados se había descrito previamente (Tabla 2). Los oligos de GAPDH fueron manualmente diseñados siguiendo las premisas siguientes:

1. Que los oligos preferentemente hibridasen entre exones.
2. Que no reconociesen otras secuencias inespecíficas dentro del genoma humano. Usando el programa BLAST descartamos estas inespecificidades.
3. La temperatura de fusión ( $T_{melting}$ ) de los pares de cebadores debía ser similar, nunca superando los 3 grados de diferencia entre los mismos.
4. Que las posibles estructuras secundarias que se formasen en el propio oligo y entre parejas de oligos no fuesen excesivamente estables.
5. Que el contenido en GCs de los oligos no fuera mayor del 60%.

Estos tres últimos puntos se comprobaron con el programa NetPrimer.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, excepto para el caso de ID4 que fue de un porcentaje de 1,5. Los niveles de expresión de los genes GAPDH y PBGD se usaron como control de normalización semicuantitativa según el caso.



GEN	SECUENCIAS	Tamaño del producto	Temp anillamiento	REF
ID4	F 5'-TCACTGCGCTCAACACCGACCC-3' R 5'-TTCCCCCTCCCTCTCTAGTGCTCCTG-3'	141 pb	64°C	Chan, et al. 2003
CACNA2D2	F 5'-GACTTCATCGAGGACCCAAA-3' R 5'-CGATGGAAGGGATCTCAAAA-3'	799 pb	62°C	Chow, et al. 2004
KIAA1456	F 5'-CCTTTAGGGATGAGGGCTTC-3' R 5'-AAGGAGGATGGTAGGGATGG-3'	294 pb	60°C	Flanagan, et al. 2004
GAPDH	F 5'-TGAAGGTCGAGTCAACGATTTGGT-3' R 5'-TTGGAGGGATCTCGTCCTGGAA-3'	242 pb	60°C	Diseño propio
PBGD	F 5'-TCGCATACAGACGGACAGTGTGGTGG-3' R 5'-CCGAAGCCGGGTGTTGAGGTTT-3'	432 pb	62°C	Chan, et al. 2003

**Tabla 2.** Secuencias de los oligos, tamaño del producto amplificado, temperaturas de anillamiento y referencias donde se obtuvo la información de los cebadores y condiciones de PCR usadas en los análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión los genes ID4, CACNA2D2, KIAA1456, GAPDH y PBGD.

#### 4.10 PCR a tiempo real

Otro de los métodos usados para la comprobación y cuantificación de los niveles diferenciales de los genes fue la técnica de PCR a tiempo real.

Para la obtención del ADNc, se partió de 1 µg del ARN total procedente de las líneas celulares o tejidos de muestras de pacientes. Se retro-transcribió a 37°C durante 2h usando el kit *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems). Después cada ADNc se analizó por triplicado usando el ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* (Applied Biosystems). La PCR se llevó a cabo utilizando la mezcla de reacción Taqman Universal PCR (Applied Biosystems), la cual contenía el reactivo ROX para normalizar las emisiones. Las sondas usadas para la amplificación de los genes diana se compraron a Applied Biosystems como *Taqman Gene Expression Assays*: CDC42 ensayo ID: Hs00741586\_mH; ID4 ensayo ID: Hs00155465\_m1; CBS ensayo ID: Hs00163925\_m1; TWIST1 ensayo ID: Hs00361186\_m1; KIAA1456 ensayo ID: Hs00332747\_m1; CACNA2D2 ensayo ID: Hs00195772\_m1; DNMT1 ensayo ID: Hs00154749\_m1; DNMT3A ensayo ID: Hs00173377\_m1; DNMT3B ensayo ID: Hs00171876\_m1; ARN ribosomal 18S ensayo ID: Hs99999901\_s1; β2-microglobulina ensayo ID: Hs99999907\_m1; y GAPDH ensayo ID: Hs99999905\_m1.

Para la detección de p16INK4a se diseñaron los cebadores Taqman: Sentido: 5'-CCAACGCACCGAATAGTTACG-3' Reverso: 5'-GGGCGCTGCCCATCA-3' y la sonda: 5'-TCGGAGGCCGATCCAGGTCATG-3'.

Los ciclos de temperatura de la PCR fueron: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 sec a 95°C y 1 min a 60°C.

Los genes  $\beta$ -2 microglobulina, el ARN ribosomal 18S o GAPDH, se amplificaron como controles internos.

La cuantificación relativa de la expresión de los genes se calculó tanto por el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  como por el método  $2^{-\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001). El método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Boletín del usuario N° 2 de Applied Biosystems (P/N 4303859)), que a partir de ahora denominaremos como “RQ”, fue el más utilizado. Consiste en calcular la expresión normalizada del gen de estudio en la muestra problema (clones de sobreexpresión e interferencia de Cdc42, las líneas celulares de cáncer de colon o los tejidos tumorales de pacientes, en cada caso) con respecto a la expresión normalizada del mismo gen en la muestra de referencia (la línea parental SW620, la línea normal de colon CCD-18Co o el tejido normal de los pacientes, respectivamente). Los datos se presentan como el “cambio en veces de expresión” (RQ) de los genes diana normalizados con un gen de referencia (18S o  $\beta$ -2 microglobulina) y relativo a una muestra control.

El método  $2^{-\Delta C_t}$ , que se denominará a partir de ahora “AQ”, fue usado como método adicional de cuantificación de los niveles de los genes de estudio en muestras de pacientes. Este método consiste en comparar los niveles normalizados de todas las muestras tumorales con los niveles de todas las normales para que dé una idea del patrón de expresión del gen de estudio en ambos tejidos. Los datos se representan como los niveles relativos del ARN mensajero del gen de estudio normalizados con el gen de referencia y multiplicado por  $10^8$  o  $10^7$ , según proceda.

#### **4.11 Extracción de ADN procedente de líneas celulares y de tejidos humanos. Modificación del ADN por tratamiento con bisulfito sódico**

Partiendo de  $5 \times 10^6$  células, en el caso de líneas celulares, o de 20 cortes de 10 micras por pieza, en el caso de tejidos humanos, se extrajo el ADN genómico usando el kit *DNeasy Tissue* (Qiagen, Inc.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se visualizó la integridad del ADN extraído en un gel de agarosa al 1%, además se cuantificó y se observó su grado de purificación en el espectrofotómetro Nanodrop ND 1000.

Se modificó 1  $\mu$ g de ADN con bisulfito sódico usando el kit de modificación *CpGenome<sup>TM</sup> DNA Modification* (Chemicon International) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El bisulfito, mediante una serie de reacciones químicas, convierte los residuos de citosinas no metiladas del ADN en uracilos; en cambio las citosinas metiladas

permanecen intactas. Después de la modificación con bisulfito, este ADN se aplicó para experimentos de PCR específica de metilación (MSP) y de secuenciación tras modificación con bisulfito (BSP) (Herman *et al.*, 1996). Se requieren dos controles para estos tipos de PCR: ADN de sangre periférica de donantes sanos como control de no metilación y un ADN genómico de varón metilado en su totalidad de forma artificial (*CpGenome<sup>TM</sup> Universal Methylated DNA*, Chemicon International) como control de metilación.

#### 4.12 PCR Específica de Metilación (MSP)

El estado de metilación de las regiones promotoras de los genes ID4, TWIST1, p16INK4a y MGMT fue analizada por la técnica de MSP. La base de esta técnica consiste en la amplificación por PCR de una zona promotora específica usando dos pares de oligos capaces de distinguir entre la forma metilada (M) de la no metilada (U) y utilizando como molde un ADN modificado con bisulfito (Herman *et al.*, 1996).

La condiciones generales de la reacción fueron: una concentración final de los pares de oligos de 750 nM; 1,5 U de ADN polimerasa (Biotools) por reacción y 35 o 40 ciclos de amplificación según la reacción. Las condiciones específicas de cada PCR se detallan en la Tabla 3.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% para ID4, TWIST1 y p16INK4a, y del 2,5% para el caso de MGMT.

#### 4.13 PCR y Secuenciación tras modificación con Bisulfito (BSP)

El estado de metilación de las islas CpG en las zonas promotoras de los genes de ID4, CACNA2D2 y KIAA1456 también se determinó por secuenciación de los productos de PCR tras la modificación del ADN con bisulfito (Clark *et al.*, 1994). Los oligos utilizados para este análisis, que reconocen indistintamente tanto la forma metilada como no metilada del ADN modificado con bisulfito, se muestran en la Tabla 3. Las condiciones de PCR se detallan a continuación para cada caso por ser muy diferentes entre los genes.

La amplificación por PCR de la región promotora de ID4 se realizó en un volumen final de reacción de 50 µl. Partiendo como molde de 2 µl de ADN modificado se llevó a cabo la PCR a lo largo de 40 ciclos usando una concentración final de los pares de oligos de 300 nM y 2,5 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) por reacción.

Para el caso de KIAA1456 se llevó a cabo una PCR anidada (*Nested PCR*). Este método es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de

amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los oligos externos (F1 y R1) para amplificar una región de ADN más extensa. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los cebadores internos (F2 y R2) para amplificar la región específica. Por tanto, la primera PCR se llevó a cabo en 20 µl finales de reacción, partiendo de 2 µl de ADN modificado con bisulfito, una concentración de cebadores F1 y R1 de 20 pmoles cada uno (Tabla 3) y 1 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) a lo largo de 40 ciclos de amplificación. A partir de 2 µl de una dilución 1:20 de esta PCR se llevó a cabo una segunda PCR usando las sondas internas F2 y R2 (Tabla 3), bajo las mismas condiciones que la primera PCR.

La región promotora de CACNA2D2 se amplificó mediante una PCR semianidada (*seminested* PCR). Esta PCR tiene la misma base que la anidada, pero se diferencia en que una de las sondas usadas en la segunda PCR es la misma que en la primera, mientras que la otra sonda reconoce una secuencia interna del fragmento inicialmente amplificado. La primera PCR se realizó en un volumen de 20 µl conteniendo 2 µl de ADN modificado, 1 µM de las sondas F y R (Tabla 3) y 2,5 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) a lo largo de 30 ciclos de amplificación. A continuación, se usó 1 µl de esta PCR para la segunda amplificación bajo las mismas condiciones pero en un volumen final de 50 µl y una concentración de 0,8 µM de las sondas FN y R (Tabla 3).

Para comprobar la correcta amplificación de las regiones promotoras, se visualizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%.

Los productos amplificados obtenidos en dichas reacciones de PCR se subclonaron en el plásmido pCR® 4-TOPO® usando el kit TOPO TA Cloning® para secuenciación (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) y se transformaron en *Escherichia coli* de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las colonias de los plásmidos recombinantes conteniendo los productos de PCR se analizaron por digestión con *EcoRI* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Se seleccionaron una serie de clones positivos para ser secuenciados con ABI-PRISM™ *d-Rhodamine Terminator Cycle Sequencing* Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un secuenciador ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando los oligos universales T7 y T3 como cebadores sentido y antisentido respectivamente

GEN	ENSAYO	SECUENCIAS	Tamaño del producto	Temp anillamiento	REF
ID4	MSP	M1 5'-TTTATAAATATAGTTGCGCGGC-3'	132 pb	55°C	Umetani, et al. 2004
		M2 5'-GAAACTCCGACTAAACCCGAT-3'			
		U1 5'-TTTATAAATATAGTTGTGTGGTGG-3'	135 pb	58°C	
		U2 5'-TCAAACTCCAATAAACCCCAAT-3'			
TWIST1	MSP	M1 5'-TTTCGGATGGGGTTGTTATC-3'	200 pb	56°C	Fackler, et al. 2003
		M2 5'-AAACGACCTAACCCGAACG-3'			
		U1 5'-TTTGGATGGGGTTGTTATGT-3'	193 pb	56°C	
		U2 5'-CCTAACCCAAACAACCAACC-3'			
p16INK4a	MSP	M1 5'-TTATTAGAGGGTGGGCGGATCGC-3'	234 pb	65°C	Herman, et al. 1996
		M2 5'-CCACCTAAATCGACCTCCGACCG-3'			
		U1 5'-TTATTAGAGGGTGGGTTGGATTGT-3'	234 pb	60°C	
		U2 5'-CCACCTAAATCAACCTCCAACCA-3'			
MGMT	MSP	M1 5'-TTTCGACGTTCTGAGGTTTTCGC-3'	89 pb	58°C	Rossi, et al. 2004
		M2 5'-GCACCTCTCCGAAAACGAAACG-3'			
		U1 5'-TTTGTGTTTGTATGTTGTAGGTTTGT-3'	93 pb	58°C	
		U2 5'-AACTCCACACTCTCCAAAAACAAAACA-3'			
ID4	BSP	F 5'-TTTATTCGGTAGTCGGATTTTCGTTTTAGTAT-3'	317 pb	60°C	Chan, et al. 2003
KIAA1456	BSP	R 5'-CCCACCGAATATCCTAATCACTCCCTTC-3'			Flanagan, et al. 2004
		F1 5'-TTTATATTATGTTGATTTTG TTTGG-3'	527 pb	50°C	
		R1 5'-ACAATCTCTACCAATAACCCACA-3'			
		F2 5'-GTTAGGTATAGTGGTTGTATTGTCAATTT-3'	424 pb		
CACNA2D2	BSP	R2 5'-CTAACTATTCACITTAATAATTTTCCAA-3'			Hesson, et al. 2004
		F 5'-TTATTATTAATTTGTGATTTTAGGTTTAAGTT-3'	415 pb	52°C	
		R 5'-TCCCTACAACGCTAACTCCAAA-3'			
		FN 5'-GTTTAAAAAGGGTTATATATGTTTGT-3'	368 pb		

**Tabla 3.** Secuencias de los oligos, tamaño del producto amplificado, temperaturas de anillamiento y referencias donde se obtuvo la información de los cebadores y condiciones de PCR usadas en los análisis del estado de metilación de las regiones promotoras de los genes ID4, TWIST1, p16INK4a, MGMT, CACNA2D2 y KIAA1456 en los ensayos tanto de MSP como de BSP.

#### 4.14 Ensayos de tumorigénesis *in vivo*

Se evaluó si la presencia de Cdc42 era un factor clave en la capacidad transformante *in vivo* de la línea humana SW620. Para ello, células SW620 transfectadas de forma estable con los vectores de expresión de Cdc42, shARN de Cdc42 o la línea parental SW620 como control, fueron inoculadas de forma subcutánea en el lomo de ratones inmunodeprimidos *BALB/c Nude* (Charles River Laboratories). Las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio DMEM sin antibióticos y sin FBS antes de la inoculación ( $10^6$  células/0,1 ml). El volumen tumoral fue estimado 2 veces por semana usando la ecuación  $V = (D \times d^2)/2$ , donde D es el diámetro mayor del tumor y d el diámetro menor.

#### 4.15 Inmunohistoquímica

Los tejidos tumorales y normales de los pacientes con cáncer colorrectal utilizados en este estudio fueron cortados en secciones de 5  $\mu$ m de bloques de los tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina. Estos bloques contenían tanto carcinoma invasivo como epitelio no tumoral adyacente. Las secciones fueron desparafinadas y la actividad peroxidasa endógena se bloqueó mediante la incubación de  $H_2O_2$  al 3% en metanol durante

10 min a temperatura ambiente. El desenmascaramiento antigénico se realizó mediante la incubación de una solución EDTA 940  $\mu$ M (pH 7,2), durante 45 min a 155°C. Los anticuerpos monoclonales primarios anti-p16 (MS-887P1, LAB VISION Corporation) y anti-Twist (Twist2C1a, Abcam) y los policlonales primarios, anti-Cdc42 (sc-87, Santa Cruz Biotechnology) y anti-Id4 (sc-491, Santa Cruz Biotechnology), se diluyeron 1:50 en BSA al 1% en TBS y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados con TBS e incubados con el kit basado en peroxidasa EnVision (Dako Cytomation) durante 30 min a temperatura ambiente. Como sustrato cromogénico se añadió diaminobenzidina (DAB) (Dako Cytomation) durante 5 min a temperatura ambiente. Las secciones se contrastaron utilizando hematoxilina-eosina, las cuales se deshidrataron progresivamente por inmersión en soluciones de alcohol de diferente grado y se secaron en xileno.

#### **4.16 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el soporte informático SPSS, version 13.0 (Inc, Chicago, Illinois). La normalidad de las distribuciones fue determinada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones de medias entre variables continuas se realizaron utilizando el test de Mann-Whitney, en el caso de distribuciones no normales, o t de *Student* para distribuciones normales. El análisis univariante entre los niveles de expresión de Cdc42, KIAA1456, CACNA2D2, ID4 o TWIST1 y los parámetros clínico-patológicos se realizaron aplicando de forma apropiada los test de Chi-cuadrado o de Fisher. La asociación entre los niveles de proteína de Cdc42 y los niveles de los distintos genes de estudio en las muestras de pacientes se llevó a cabo utilizando el test exacto de Fisher y el test de Mann-Whitney. Todas las *p-value* indicadas son de dos colas, estableciéndose la significancia estadística como  $p \leq 0,05$ .

#### **4.17 Consideraciones éticas**

El uso de las muestras procedentes de tumores humanos para este estudio ha sido aprobado por el comité ético del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Todos los pacientes dieron un consentimiento informado. Asimismo, todos los animales de experimentación utilizados en este trabajo han sido mantenidos bajo las condiciones estándar de laboratorio siguiendo las directrices de la autoridad competente del Gobierno Español.

## **RESULTADOS**





## 5 Resultados

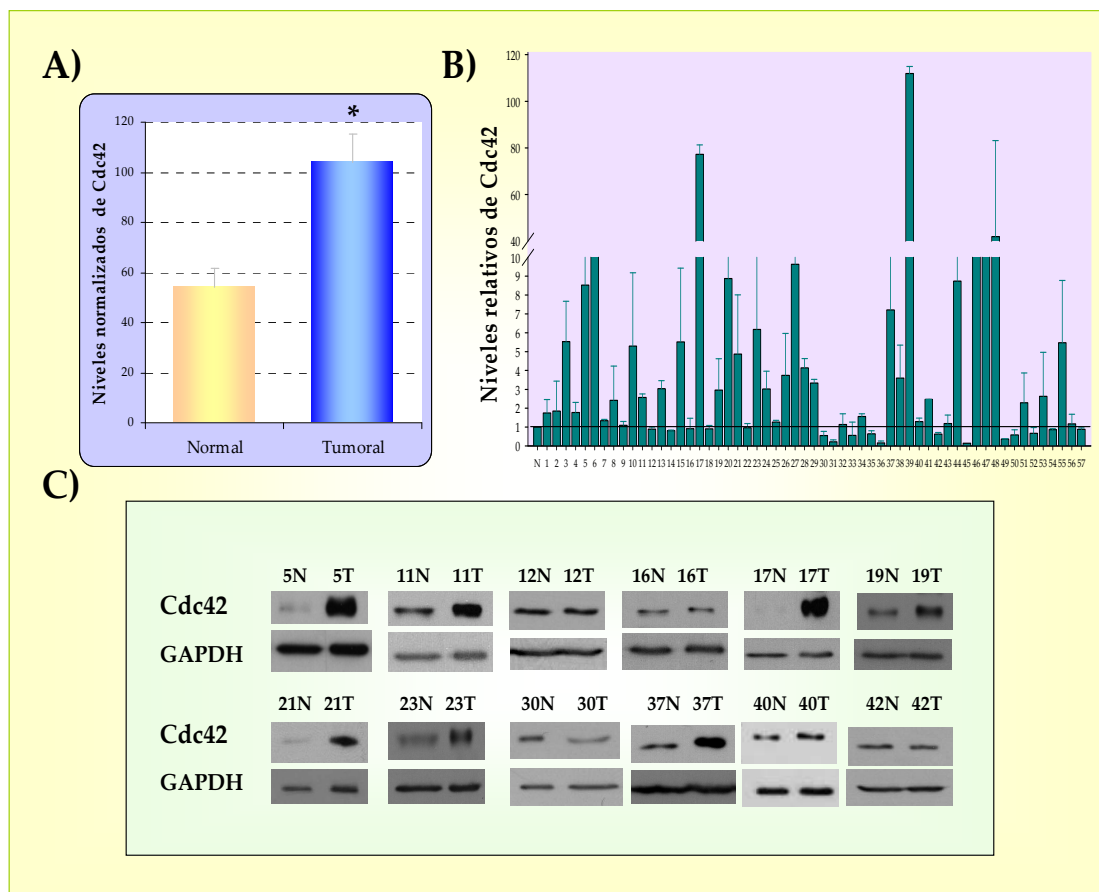
### 5.1 Estudio de los niveles de expresión de Cdc42 en muestras de pacientes con cáncer colorrectal

Diversos análisis por inmunodetección o inmunohistoquímica han demostrado que Cdc42 se encuentra incrementado en cáncer de mama, testicular, melanoma y cáncer de cabeza y cuello (Abraham *et al.*, 2001; Fritz *et al.*, 2002; Kamai *et al.*, 2004; Tucci *et al.*, 2007). Sin embargo, su papel en carcinogénesis parece ser específico de tejido, ya que también se ha encontrado que puede inhibir algunos pasos de la tumorigénesis (Chuang *et al.*, 1997; van Hengel *et al.*, 2008). Por lo tanto, se hace preciso estudiar el papel de Cdc42 en cada tipo tumoral. Con el objetivo de investigar la relevancia de Cdc42 en el desarrollo del cáncer colorrectal, se analizaron los niveles de expresión de la proteína Cdc42 y la relación de su grado de expresión con los distintos parámetros clínico-patológicos disponibles.

#### 5.1.1 *Cdc42 se encuentra significativamente sobreexpresado en cáncer colorrectal*

Se estudiaron los niveles de expresión de la proteína Cdc42 en 57 pacientes con adenocarcinoma colorrectal. La proteína fue extraída de los tejidos tumorales y de su correspondiente tejido normal adyacente, procedente del mismo individuo. Los niveles de Cdc42 fueron analizados por inmunodetección usando un anticuerpo monoclonal específico y se normalizaron según la intensidad del control de carga GAPDH.

La expresión de Cdc42 en todos los tejidos normales se comparó con la mostrada en todos los tejidos tumorales, encontrándose que Cdc42 se sobreexpresaba de forma significativa en las muestras tumorales analizadas ( $p < 0,0001$ ) (Figura 6A). Para comparar la expresión de Cdc42 en cada paciente, los niveles de esta GTPasa Rho se relativizaron en cada tejido tumoral con respecto a su correspondiente tejido normal. Se encontró que 33 muestras de las 57 totales (57,9%), presentaban al menos 1,5 veces más niveles de expresión de Cdc42 en los tumores que en los tejidos normales correspondientes (Figura 6B). En la Figura 6C se muestran algunos ejemplos representativos del análisis. Estos resultados indican que Cdc42 se sobreexpresa con una elevada incidencia y de forma significativa en pacientes con cáncer colorrectal.



**Figura 6. Los niveles de Cdc42 se encuentran incrementados en muestras de pacientes con cáncer colorrectal.** Los extractos de proteína total procedentes de tejidos tumorales y sus correspondientes tejidos normales adyacentes, de 57 pacientes con cáncer colorrectal, se resolvieron en PAGE-SDS al 15% y fueron transferidos a membranas de PVDF. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo específico contra la proteína Cdc42. La intensidad de las bandas fue densitometrada con el programa Imagen. Como control de carga se utilizó GAPDH. **A)** Los niveles de Cdc42 normalizados con GAPDH de todas las muestras normales fueron comparados con los niveles normalizados de todas las muestras tumorales (\* indica  $p < 0,0001$ ). Los datos representados corresponden a la mediana de las densidades ópticas  $\times 10^2 \pm \text{SEM}$ . **B)** Niveles de expresión de Cdc42 en cada tejido tumoral normalizado con GAPDH y relativizado con respecto a los niveles normalizados de su correspondiente tejido normal. El valor de cada tejido normal fue normalizado a "1" (representado por "N" e indicado por la línea horizontal). Los datos que se muestran corresponden a la media de las densidades ópticas de tres experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar. **C)** Ejemplos representativos del análisis de los niveles de Cdc42 por inmunodetección en tejidos tumorales y normales de pacientes con cáncer colorrectal.

### 5.1.2 Los niveles de Cdc42 se asocian con el número de ganglios afectados por el tumor y con el grado de diferenciación

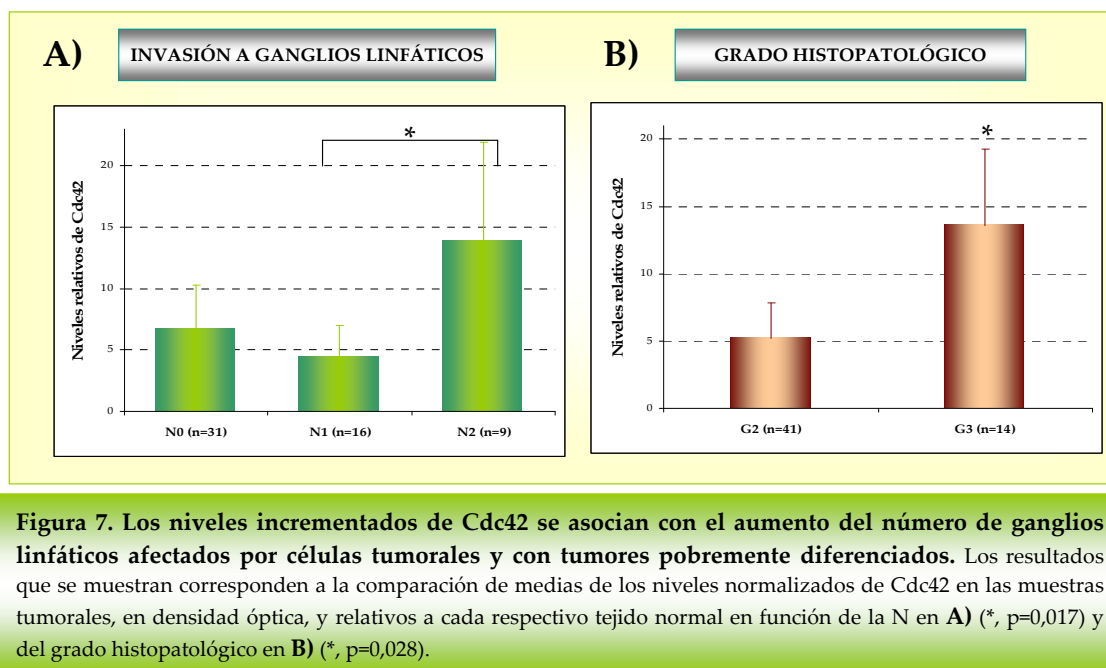
Con el objetivo de estudiar la posible relevancia de Cdc42 en el desarrollo de cáncer colorrectal, se analizó la relación entre los niveles de Cdc42 y las características clínico-patológicas del tumor (Tabla 4). Como resultado de este análisis, se observó que la sobreexpresión de Cdc42 es independiente de la edad, el sexo del paciente, el tamaño del tumor primario (T), la localización del tumor (colon o recto) y la invasión linfo-vascular peritumoral (Tabla 4). Sin embargo, se encontró que existía una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de Cdc42 y el número de ganglios linfáticos

regionales invadidos por células tumorales, es decir, en el paso de N1 a N2 ( $p=0,017$ ) (Figura 7A). Asimismo, se halló que la expresión de Cdc42 estaba incrementada en las muestras tumorales cuando se trataba de tumores pobremente diferenciados, es decir, en el estadio G3 ( $p=0,028$ ) (Figura 7B).

Este hallazgo sugiere que la sobreexpresión de Cdc42 podría estar asociada con un fenotipo tumoral más agresivo, ya que ambos parámetros, el incremento de más de tres ganglios invadidos por células cancerígenas y el grado histopatológico, se pueden relacionar con pacientes con un peor pronóstico (O'Connell *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2003).

	Total	Niveles de Cdc42 (punto de corte 1,5)		valor <i>p</i>
	n=57	Bajos (n=24 )	Altos (n= 33)	
Edad (años) media ± SEM	71,00 ± 1,24	73,42 ± 1,49	69,24 ± 1,80	0,096*
	Total	Niveles de Cdc42 (Media ± SEM)		valor <i>p</i>
Sexo, n(%)				
Hombres	39 ( 68,4)	5,02 ± 2,00		0,114**
Mujeres	18 (31,6)	12,28 ± 6,28		
Tumor primario (T), n(%)				
T2	5 (8,8)	3,15 ± 1,06		0,982***
T3	43 (75,4)	7,47 ± 3,07		
T4	9 (15,8)	8,88 ± 4,51		
Nodulos linfáticos (N), n(%)				
N0	31 (54,4)	6,68 ± 3,57		0,037***
N1	16 (28,1)	4,44 ± 2,56		
N2	9 (15,8)	13,85 ± 8,08		
NX	1(1,8)			
Grado histopatológico, n(%)				
G1	2 (3,5)	7,39 ± 6,75		0,028**
G2	41 (71,9)	5,17 ± 2,69		
G3	14 (24,6)	13,58 ± 5,71		
Tipo de cáncer colorrectal				
Cáncer de colon	38 (66,7)	8,53 ± 3,57		0,926**
Cáncer de recto	19 (33,3)	4,87 ± 1,28		
Invasión linfo-vascular				
No	21 (36,8)	5,53 ± 2,02		0,800**
Sí	18 (31,6)	13,81 ± 7,15		
Sin información	18 (31,6)			
* T de Student				
** Test de Mann Whitney				
*** Test de Kruskal-Wallis				

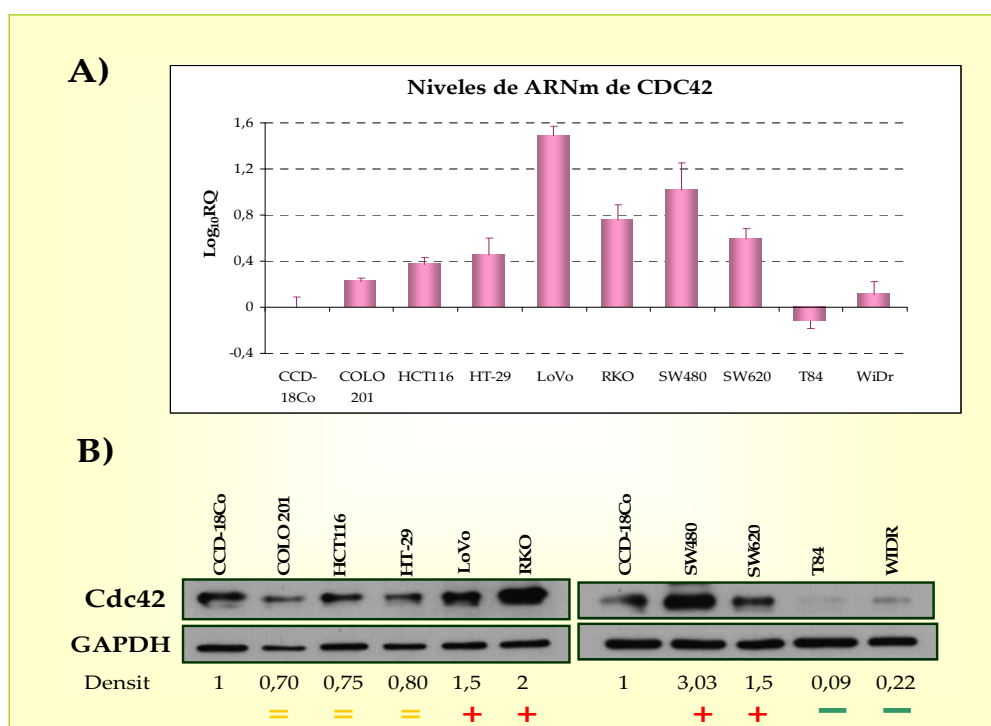
**Tabla 4. Datos clínico-patológicos de los 57 pacientes con cáncer colorrectal analizados.** Se muestra la comparación de medias entre los valores de Cdc42 en las muestras tumorales relativos a sus correspondientes tejidos normales y los parámetros clínico-patológicos (media  $\pm$  SEM). Sólo para el dato de la edad se estableció un punto de corte de 1,5 veces de expresión de Cdc42 para distribuir a los pacientes de las distintas edades. Se muestra el valor  $p$  del test estadístico apropiado aplicado en cada caso.



## 5.2 Selección de una línea de cáncer colorrectal como modelo de estudio *in vitro* del papel de Cdc42

Una vez encontrado que Cdc42 se sobreexpresa de forma significativa en pacientes con cáncer colorrectal, y que dicho incremento podría jugar un papel clave en la progresión de este tipo tumoral, se quiso investigar el mecanismo molecular por el cual este miembro Rho está ejerciendo su efecto tumorigénico. Para ello, se propuso un estudio *in vitro* donde, a partir de una línea celular derivada de cáncer colorrectal humano, se modulasen genéticamente los niveles de Cdc42. Para la elección del modelo celular *in vitro*, se cuantificaron los niveles de ARN mensajero y de proteína de Cdc42 mediante PCR a tiempo real y ensayos de inmunodetección, respectivamente, en una batería de nueve líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal humano, y se compararon con la línea normal de colon, CCD-18Co. Al analizar los niveles transcripcionales de CDC42, se observó que, 6 de las 9 líneas (66,7%), HCT116, HT-29, LoVo, RKO, SW620 y SW480 presentaban niveles superiores de CDC42, con respecto a la línea celular normal de colon. Sin embargo, el grado de expresión de esta GTPasa Rho era similar a la línea CCD-18Co para el caso de las líneas COLO 201, T84 y WiDr (Figura 8A). Como se muestra en la Figura 8B, la expresión de proteína Cdc42 en 4 (LoVo, RKO, SW480 y SW620) de las 9 líneas tumorales analizadas (44,4%) presentaban niveles superiores a la línea normal de colon; 3 líneas, COLO 201, HCT116 y HT-29, exhibían niveles similares a CCD-18Co y,

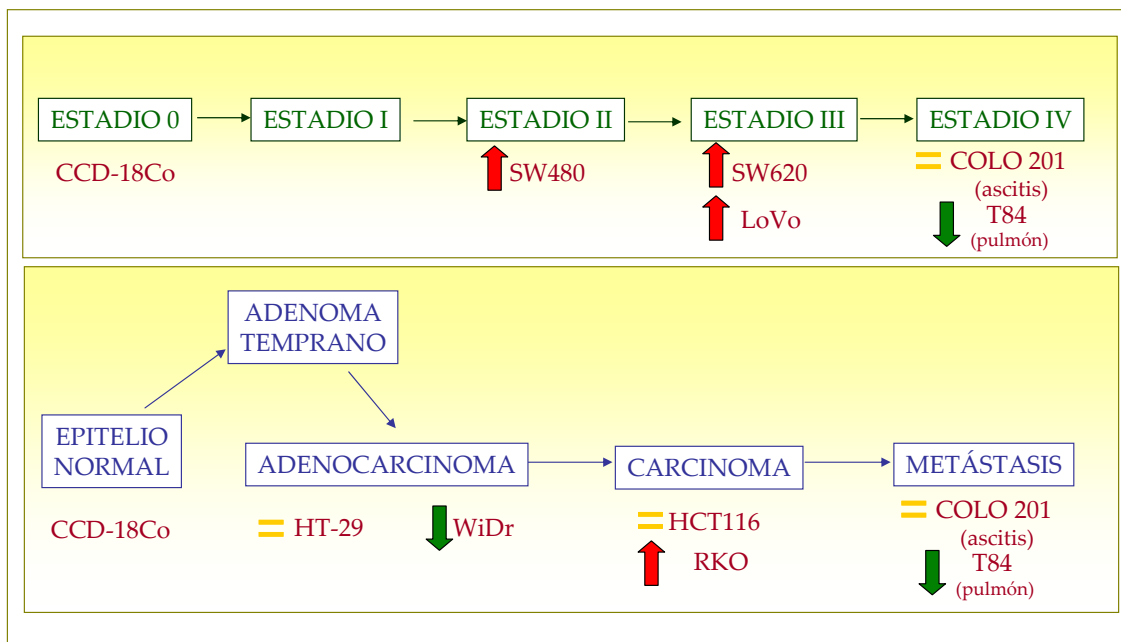
finalmente, las líneas T84 y WiDr mostraban niveles inferiores. Por tanto, no se observó una correlación cuantitativa entre los niveles de ARNm y proteína de Cdc42, no obstante se distinguía una similitud cualitativa cuando las líneas se agrupaban según sus niveles de expresión (sin relativizarlas respecto a los niveles de la línea primaria de colon). De esta forma las líneas se clasificaron en tres grupos: niveles elevados (LoVo, RKO y SW480), niveles intermedios (HCT116, HT-29 y SW620) y niveles bajos (COLO 201, WiDr y T84) (Figura 8). Para la selección definitiva de la línea celular se tuvo en cuenta el dato obtenido de los niveles de proteína, ya que refleja la funcionalidad de la misma y se asemeja a lo que le ocurre, de forma más frecuente, a la familia de GTPasas Rho en tumores humanos y, en concreto, a Cdc42 en tumores colorrectales.



**Figura 8. Niveles de expresión de Cdc42 en distintas líneas celulares derivadas de adenocarcinoma colorrectal humano.** **A)** El ARN total extraído de las líneas celulares indicadas se retro-transcribió y utilizó para la detección por PCR cuantitativa del gen CDC42. Como control interno se determinaron los niveles de expresión del gen  $\beta$ -2 microglobulina. Los datos se representan como el  $\log_{10}$  RQ, siendo RQ la cantidad de Cdc42 en cada línea relativa a la cantidad de Cdc42 en la línea normal de colon, CCD-18Co. La desviación estándar se representa como  $\log_{10}(RQ_{\max}) - \log_{10}(RQ)$ . **B)** Los extractos de proteína total procedentes de las líneas celulares se resolvieron en una PAGE-SDS al 15% y fueron transferidos a membranas de PVDF. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo específico contra la proteína Cdc42. Como control de carga se utilizó GAPDH. Se realizó la densitometría de los niveles de proteína Cdc42 normalizados con GAPDH y relativizados con respecto a la línea normal de colon CCD-18Co.

Distribuyendo a estas líneas celulares en función de las distintas etapas clínicas y/o histopatológicas del cáncer colorrectal del que derivan, se observó que las líneas con los niveles de proteína Cdc42 superiores a la línea normal se localizaban principalmente en los

estadios II y III, y en la etapa de carcinoma, dato que concuerda con lo observado en las muestras clínicas (Figura 9).



**Figura 9. Clasificación de las líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal humano.** El panel superior muestra la clasificación de algunas de las líneas celulares de cáncer colorrectal utilizadas en este estudio en función del estadio clínico. El panel inferior indica la agrupación de algunas de las líneas celulares de cáncer colorrectal en función de la etapa histopatológica del tumor del que derivan. Estos datos han sido obtenidos de la información facilitada por la ATCC. La flecha de color rojo indica niveles de expresión de la proteína Cdc42 superiores a la línea normal de colon CCD-18Co, la flecha de color verde indica niveles inferiores y el símbolo "igual" de color amarillo indica los mismos niveles proteicos de Cdc42 comparados con la línea normal.

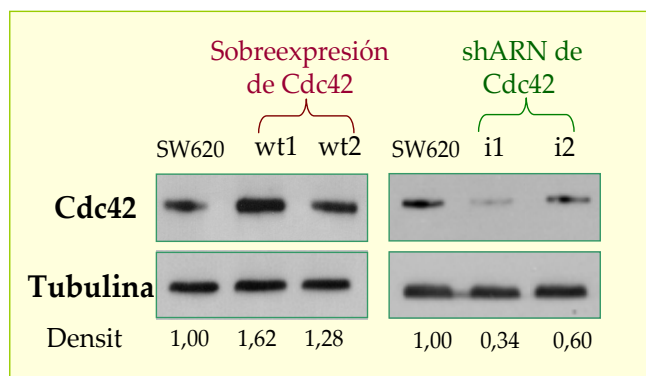
El objetivo del modelo *in vitro* consistía en modular la expresión de Cdc42 mediante el aumento y la disminución de sus niveles basales. Por ello, se eligió una línea celular cuyo grado de expresión y progresión tumoral fuesen intermedios (Figura 9). Consecuentemente, la línea celular elegida para dicho estudio fue SW620, la cual cumple ambos requisitos de expresión de Cdc42 (1,5 veces más que la línea primaria CCD-18Co), y de progresión (estadio III, según la información obtenida de la ATCC).

### 5.3 Generación de clones estables de sobreexpresión e interferencia de Cdc42

Para el estudio del papel de Cdc42 en la carcinogénesis colorrectal se modularon, por ingeniería genética, los niveles de expresión de Cdc42 en la línea seleccionada SW620. Esta estrategia tiene el objetivo de comprobar el efecto sobre el proceso tumoral producido por la presencia o ausencia de Cdc42. Para que este modelo *in vitro* se asemejase de la forma más fiel posible a lo que ocurre en los tumores humanos se establecieron una serie de premisas para su generación:

- La alteración genética de Cdc42 debía ser estable, ya que en tumores humanos si una desregulación en un gen proporciona una ventaja selectiva, se mantiene a lo largo del tiempo y se va acumulando con otras alteraciones para dar lugar a un fenotipo tumoral cada vez más agresivo (Fearon & Vogelstein, 1990).
- Como ya se ha indicado, las GTPasas Rho, al contrario que la proteína Ras, no presentan mutaciones, sino que muchos de sus miembros, incluido Cdc42, se encuentran sobreexpresados en tumores humanos. Consecuentemente, para el modelo *in vitro* se optó por sobreexpresar la forma salvaje de Cdc42 en lugar de la forma constitutivamente activa.
- Para disminuir los niveles endógenos de la proteína Cdc42, se optó por el diseño de una horquilla de ARN de interferencia (shARN) frente al gen CDC42 humano (Brummelkamp *et al.*, 2002). Esta novedosa tecnología permitiría silenciar de forma específica a Cdc42 sin afectar a otro miembro de la familia Rho, con los que comparte alta homología (Wennerberg & Der, 2004).

La generación de los clones de sobreexpresión (Cdc42wt) y de interferencia (Cdc42i) de Cdc42 en la línea SW620 se llevó a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Se aislaron un total de 15 clones de sobreexpresión y 13 de interferencia (datos no mostrados), que aseguraría una población de clones suficiente para comprobar la reproducibilidad de los resultados en cada grupo. Para nuestro estudio, se eligieron dos clones de cada grupo: Cdc42wt1 y Cdc42wt2 de sobreexpresión; Cdc42i1 y Cdc42i2 de interferencia, y como control la línea parental SW620 (Figura 10). Como se puede observar en la Figura 10, los dos transfectantes estables para la sobreexpresión seleccionados, al igual que los 13 restantes, presentaban un aumento discreto de la proteína Cdc42 (1,62 para el clon wt1 y 1,28 para el clon wt2). Este pequeño aumento puede deberse a que la línea SW620 ya posee unos niveles elevados y suficientes para que Cdc42 ejerza su papel oncogénico, por ello, la propia maquinaria celular podría estar regulando este incremento. En el caso de la interferencia genética, se eligieron dos clones con distintos niveles de reducción en la expresión de Cdc42 (0,34 el clon i1 y 0,60 el clon i2), lo que permitiría investigar si los efectos de Cdc42 son dependientes de la dosis (Figura 10).



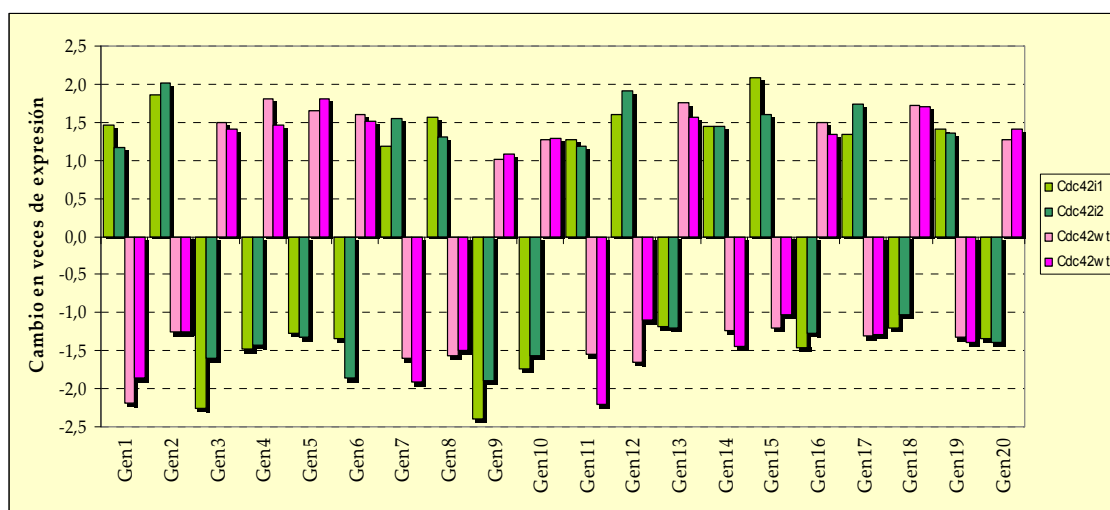
**Figura 10. Selección de los clones estables de sobreexpresión e interferencia de Cdc42 derivados de la línea SW620.** Los extractos de proteína total procedentes de los clones estables se resolvieron en una PAGE-SDS al 15% y fueron transferidos a membranas de PVDF. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo específico contra la proteína Cdc42. Los niveles de expresión de Cdc42 se densitometraron y normalizaron con tubulina. Se seleccionaron dos clones de cada grupo, los de sobreexpresión se indican como wt1 y wt2, y los de interferencia como i1 e i2. En el caso de la interferencia de Cdc42 se seleccionaron clones con distinto grado de reducción de los niveles de Cdc42. Densit= densitometría, shARN: horquilla de ARN de interferencia

#### 5.4 Identificación de las dianas transcripcionales de Cdc42 en la línea SW620. Microarrays de expresión génica

Como ya se ha señalado, la regulación transcripcional es una de las funciones que se ha asociado con el papel oncogénico de algunos miembros de la familia Rho (Benitah *et al.*, 2004; Berenjeno *et al.*, 2007). Hasta la fecha, existen pocas evidencias del papel de Cdc42 en regulación transcripcional en el contexto de la carcinogénesis, sobre todo a la hora de regular la expresión de oncogenes o genes oncosupresores (Benitah *et al.*, 2003). Con el objetivo de detectar las dianas transcripcionales de Cdc42 en el contexto del cáncer colorrectal, se planteó el desarrollo de un estudio de regulación transcriptómica global. Para ello, se analizó el patrón de expresión génica de los clones estables generados utilizando la plataforma de microarrays Human 19k Oligo Array. El diseño experimental y metodología se realizó tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos.

Los criterios para la selección de los genes alterados fueron: un *p-value* menor de 0,05 y que el cambio en la expresión, tanto por represión como por inducción, fuese mayor de 1,5 veces entre las clases predeterminadas de sobreexpresión *versus* interferencia de Cdc42 (teniendo en cuenta la media relativa de cada grupo). Como resultado de este análisis, se identificaron 190 genes cuya expresión transcripcional estaba siendo alterada por Cdc42, de los cuales 89 se inducían y 101 se reprimían. Estos genes seleccionados cumplían el requisito de que el valor de la media de la réplica experimental tenía el mismo comportamiento de represión o inducción en los 2 clones de cada grupo (réplicas biológicas), y que dichos cambios fuesen contrarios entre grupos (Figura 11).



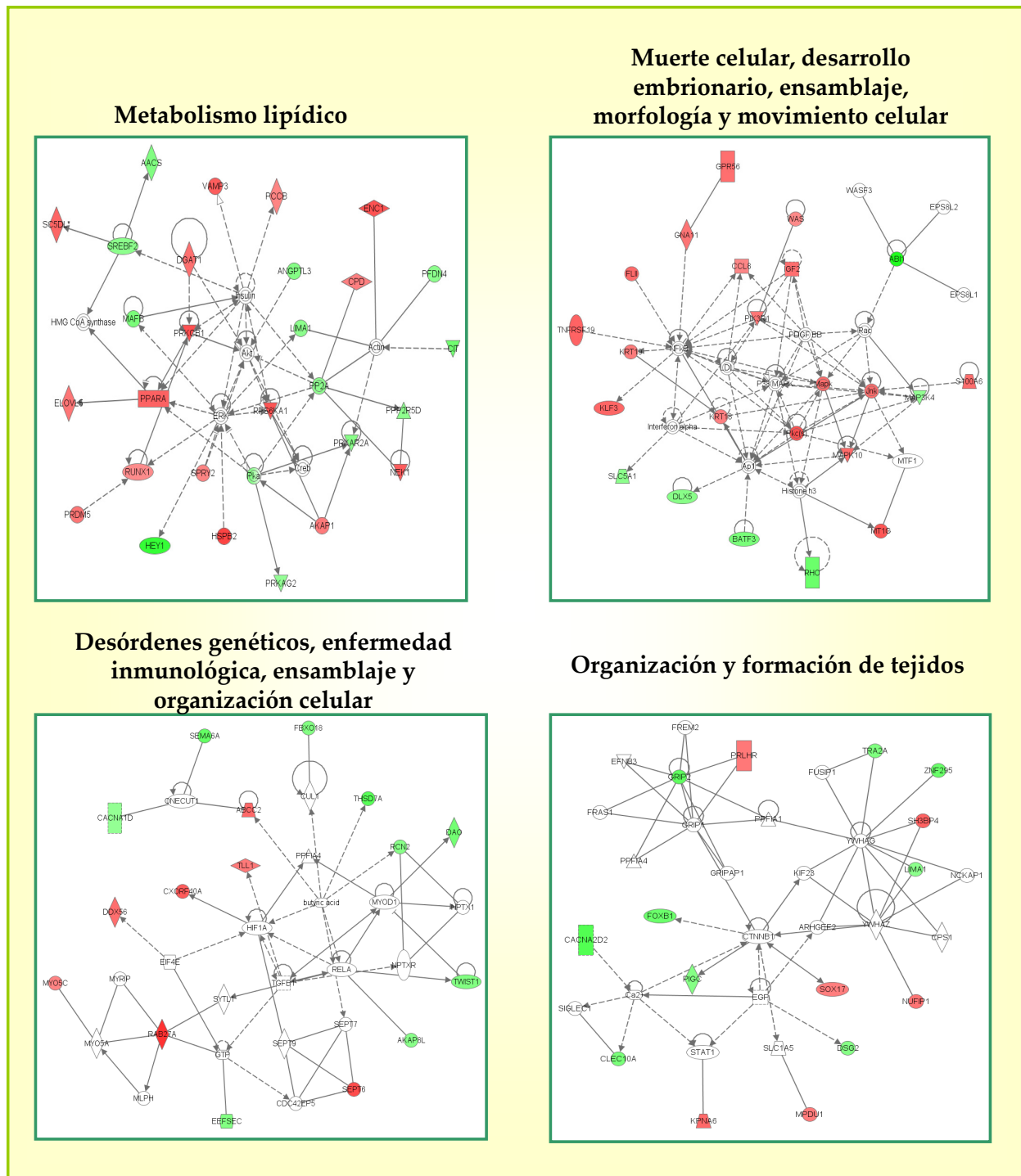


**Figura 11. Patrón de expresión diferencial de los genes regulados transcripcionalmente por Cdc42.**

Ejemplo representativo de una serie de genes regulados por Cdc42 para un  $p\text{-value} < 0,05$ . Los 190 genes seleccionados cumplían el requisito de que cada uno de los clones del mismo grupo (réplicas biológicas) tuviese el mismo comportamiento de represión o inducción transcripcional y opuesto al comportamiento del otro grupo. Los datos se presentan como el “cambio en veces de expresión” relativo a la media de la réplica experimental de cada clon. Sólo se seleccionaron aquellos genes que cumplían que la diferencia de expresión entre las clases predeterminadas (sobreexpresión e interferencia) fuese como mínimo de 1,5 en veces de expresión.

Para dar una interpretación biológica a estos resultados y encontrar rutas de señalización comunes donde estuviesen implicados algunos de los genes alterados por Cdc42, se utilizaron la base de datos NCBI, en concreto los datos aportados por el *PubMed* y *Gene*, y el programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). De los 190 genes, 33 tenían una función desconocida. El programa IPA fue utilizado para integrar de forma global a los 157 genes restantes en redes de funcionalidad. Así, se encontraron 7 rutas donde se englobaban la mayoría de los genes seleccionados (Figura 12). Estas redes, según su orden de mayor probabilidad establecido por IPA, son:

1. Metabolismo lipídico.
2. Muerte celular, desarrollo embrionario, ensamblaje, morfología y movimiento celular.
3. Desórdenes genéticos, enfermedad inmunológica, ensamblaje y organización celular.
4. Organización y formación de tejidos.
5. Expresión génica y cáncer.
6. Transporte molecular, desarrollo celular, desarrollo y función del sistema esquelético y muscular.
7. Metabolismo de aminoácidos, modificaciones post-traduccionales y bioquímica de moléculas pequeñas.



**Figura 12. Redes funcionales en las que Cdc42 podría tener un papel relevante según el análisis proporcionado por IPA.** A modo de ejemplo representativo, se muestran las 4 redes funcionales más relevantes, en las que se engloban la gran mayoría de los 157 genes regulados transcripcionalmente por Cdc42. Los genes se representan como nodos con distintas formas geométricas dependiendo de la función de sus respectivas proteínas. La relación molecular entre dos nodos se representa con una línea o flecha que es continua o discontinua, en función del tipo de conexión (inhibición, activación, interacción, modificación, etc.) y de la relación directa o indirecta, respectivamente. Todas las conexiones están apoyadas por al menos una referencia bibliográfica registrada en IPA. La intensidad de los nodos indica el grado de inducción (rojo) o represión (verde) producido por Cdc42. Los genes de color blanco son genes que no están regulados por Cdc42 pero que están relacionados en la misma ruta de señalización que varios de los genes del estudio.

Estos resultados, por un lado, confirman funciones previamente descritas para Cdc42 a nivel fisiológico y en el contexto carcinogénico como son ensamblaje y organización celular, transporte molecular, muerte celular, desarrollo embrionario, migración y expresión génica (Cerione, 2004; Gomez del Pulgar *et al.*, 2005; Heasman & Ridley, 2008; Vega & Ridley, 2008). Por otro lado, sugieren nuevas funciones moleculares por las que Cdc42 podría estar implicado en carcinogénesis debido a su papel en el metabolismo lipídico, desórdenes genéticos, función del sistema esquelético y muscular, metabolismo de aminoácidos, modificaciones postraduccionales y bioquímica de moléculas pequeñas. Estos resultados sugieren que el papel de Cdc42 en la tumorigénesis colorrectal podría deberse a su función de regulación transcripcional de genes claves en procesos relacionados con el desarrollo y progresión del cáncer.

Para estudiar en detalle los genes regulados por Cdc42 que podrían estar actuando como oncogenes o genes oncosupresores, se utilizó la bibliografía proporcionada tanto por NCBI como por IPA. Como resultado de este estudio, se seleccionaron 26 genes inducidos por Cdc42 cuyo papel como oncogenes ya había sido previamente descrito (Tabla 5). Por otro lado, se obtuvo una lista de 21 genes con un posible papel como genes oncosupresores, los cuales se inducían cuando Cdc42 se encontraba disminuido por el efecto del shARN (Tabla 6). Estos resultados sugieren que la contribución de Cdc42 en el desarrollo de cáncer colorrectal podría ser a través del control de la transcripción de posibles oncogenes y genes oncosupresores.

Símbolo del gen	Número de GeneBank	Nombre del gen	Diferencia en veces de expresión	Valor de <i>p</i>	Sobreexpresión en cáncer
CPD	NM_001304	<i>carboxypeptidase D</i>	1,67	0,0157227	Adenomas pituitarios Cáncer de mama Tumor hematopoyético
ENC1	NM_003633	<i>ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)</i>	2,27	0,0049583	Cáncer de colon Mieloblastoma Meduloblastoma
HSPB2	NM_001541	<i>heat shock 27kDa protein 2</i>	2,46	0,0013617	Cáncer de hígado Cáncer de cuello de útero Cáncer de mama
PRKCB1	NM_002738	<i>protein kinase C, beta 1</i>	2,29	0,0043987	Múltiples tipos de cáncer entre ellos cáncer de colon
RPS6KA1	NM_002953	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1</i>	2,24	0,0028695	Cáncer de próstata Cáncer de mama Cáncer de pulmón Melanoma
RUNX1	X90978	<i>runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene)</i>	1,51	0,035633	Leucemia mieloide aguda
CCL8	NM_005623	<i>chemokine (C-C motif) ligand 8</i>	1,58	0,0308036	Leucemia Cáncer gástrico
GNA11	AL110227	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)</i>	1,83	0,0064986	Cáncer de ovario
GPR56	NM_005682	<i>G protein-coupled receptor 56</i>	1,89	0,030281	Melanoma Glioma
IGF2	AK025719	<i>insulin-like growth factor 2</i>	1,89	0,0315803	Múltiples tipos de cáncer entre ellos cáncer de colon
KLF3	NM_016531	<i>Kruppel-like factor 3 (basic)</i>	2,02	0,0319678	Cáncer de cuello de útero Leucemia
KRT19	NM_002276	<i>keratin 19</i>	1,72	0,0113713	Cáncer de colon Cáncer de mama Cáncer de páncreas Cáncer de pulmón
MAPK10	NM_002753	<i>mitogen-activated protein kinase 10</i>	1,93	0,0118527	Cáncer de tiroides Linfoma folicular
PIK3R1	U49349	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>	1,79	0,0098206	Múltiples tipos de cáncer entre ellos cáncer de colon
S100A6	NM_014624	<i>S100 calcium binding protein A6</i>	1,92	0,0044593	Múltiples tipos de cáncer entre ellos cáncer de colon
TNFRSF19	NM_018647	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19</i>	2,05	0,0046585	Melanoma
ABCC2	NM_000392	<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2</i>	1,98	0,0056937	Cáncer de hígado Cáncer de pulmón Cáncer de mama
RAB27A	NM_004580	<i>RAB27A, member RAS oncogene family</i>	2,70	0,0361446	Cáncer de mama
NUFIP1	NM_012345	<i>nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1</i>	1,84	0,0249464	Cáncer de colon
SH3BP4	NM_014521	<i>SH3-domain binding protein 4</i>	2,07	0,0106587	Cáncer de mama
CCL15	NM_004167	<i>chemokine (C-C motif) ligand 15</i>	1,73	0,0115531	Cáncer de pulmón
SMS	NM_004595	<i>spermine synthase</i>	1,77	0,0278531	Cáncer de próstata
REG1P	D56495	<i>regenerating islet-derived 1 pseudogene</i>	2,10	0,0052758	Cáncer de pulmón
YY1	AK026497	<i>YY1 transcription factor</i>	1,82	0,0158969	Osteosarcoma Cáncer de mama Linfoma
PCGF3	AL359562	<i>polycomb group ring finger 3</i>	2,14	0,0177404	Cáncer de próstata
LIMCH1	AB029025	<i>LIM and calponin homology domains 1</i>	2,01	0,0184965	Cáncer de cuello de útero Cáncer de pulmón

**Tabla 5. Lista de oncogenes inducidos por Cdc42 en la línea SW620.** Utilizando la bibliografía proporcionada por NCBI e IPA, se seleccionaron 26 genes que se han identificado como oncogenes en al menos un tipo tumoral.

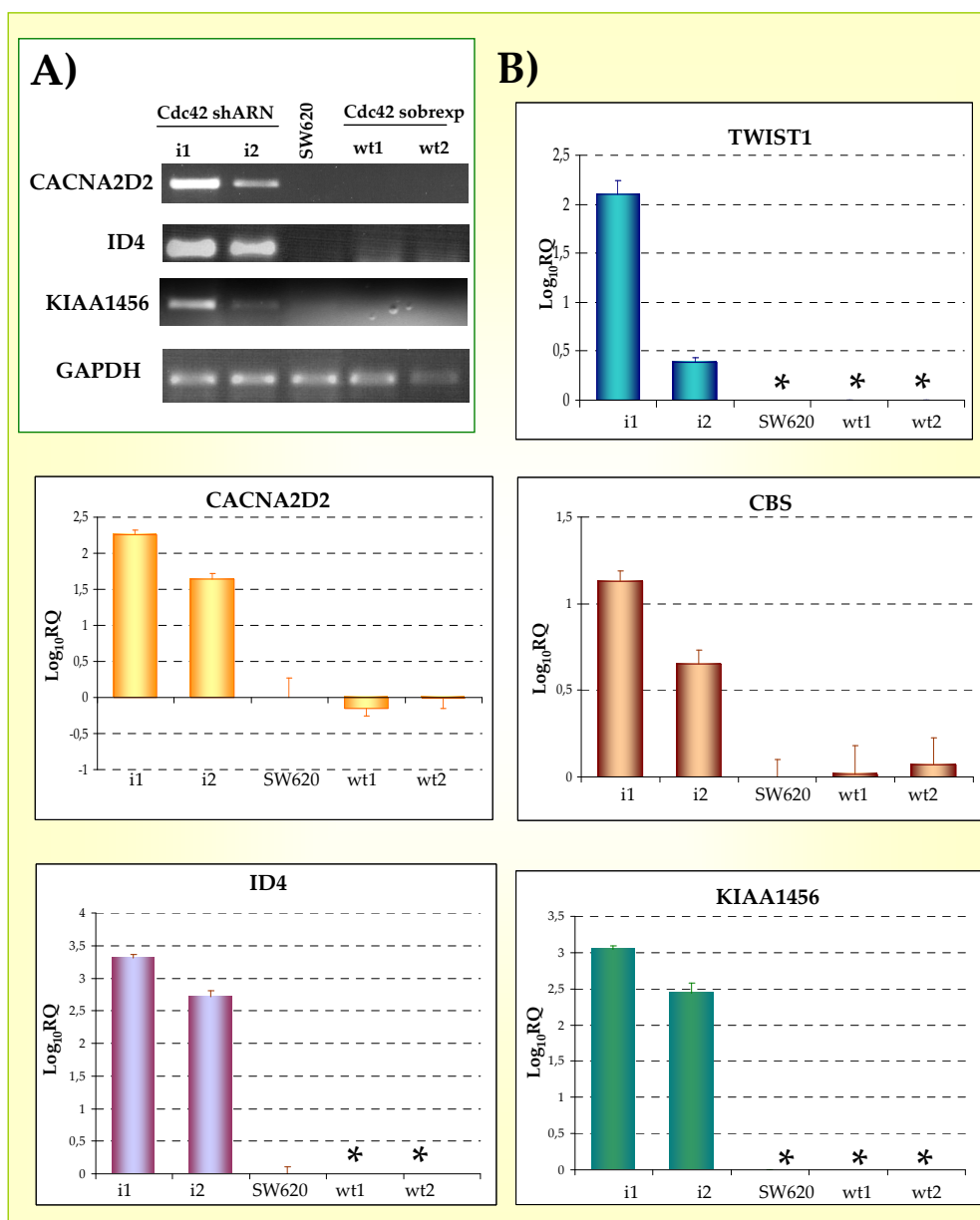
Símbolo del gen	Número de GeneBank	Nombre del gen	Diferencia en veces de expresión	Valor de <i>p</i>	Represión en cáncer
HEY1	NM_012258	<i>hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif 1</i>	-2,84	0,0025836	Cáncer de próstata
LIMA1	NM_016357	<i>LIM domain and actin binding 1</i>	-1,63	0,0171053	Cáncer de colon Cáncer oral Cáncer de próstata Cáncer de mama
MAFB	NM_005461	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)</i>	-1,87	0,0049807	Leucemia mieloide aguda
BATF3	NM_018664	<i>basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3</i>	-1,89	0,0268707	Cáncer de hígado
DLX5	NM_005221	<i>distal-less homeobox 5</i>	-1,67	0,0326023	Cáncer de colon Leucemia linfoblástica crónica
DAO	NM_001917	<i>D-amino-acid oxidase</i>	-1,99	0,0046249	Glioma
SEMA6A	AF279656	<i>semaphorin 6A-1</i>	-2,20	0,0017382	Leucemia
TWIST1	Y11177	<i>twist homolog 1</i>	-1,77	0,0155542	Cáncer gástrico Cáncer de pulmón Cáncer de cuello de útero Neuroblastoma Cáncer de mama
CACNA2D2	NM_006030	<i>calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2</i>	-2,45	0,0405004	Glioma Cáncer de pulmón Cáncer de cabeza y cuello Cáncer nasofaríngeo
DSG2	NM_001943	<i>desmoglein 2</i>	-1,72	0,0111488	Cáncer de vejiga
TRA2A	NM_013293	<i>transformer-2 alpha</i>	-1,82	0,0177433	Cáncer de ovario
LARS2	NM_015340	<i>leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial</i>	-1,78	0,0238371	Cáncer de páncreas
CBS	NM_000071	<i>cystathionine-beta-synthase</i>	-2,05	0,0267127	Múltiples tipos de cáncer entre ellos cáncer de colon
PCDHGC3	NM_002588	<i>protocadherin gamma subfamily C, 3</i>	-2,95	0,0069556	Fibroblastos transformados con v-fos
PDZD2	AB002298	<i>PDZ domain containing 2</i>	-1,67	0,0164196	Cáncer de próstata
NEFM	NM_005382	<i>neurofilament, medium polypeptide 150kDa</i>	-1,70	0,020173	Cáncer de páncreas
ID4	NM_001546	<i>inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	-2,06	0,0217012	Múltiples tipos de cáncer entre ellos cáncer de colon
APTX	NM_017692	<i>aprataxin</i>	-1,55	0,0281749	Predisposición a cáncer protege de estrés genotóxico
GML	NM_002066	<i>glycosylphosphatidylinositol anchored molecule like protein</i>	-1,58	0,0294491	Cáncer de colon NSCLC Cáncer de esófago Glioblastoma
C8orf79-KIAA1456	AB040889	<i>chromosome 8 open reading frame 79</i>	-1,53	0,0370104	Cáncer de colon
SESN1	NM_014454	<i>sestrin 1</i>	-1,50	0,0477365	Cáncer testicular Linfoma

**Tabla 6. Lista de genes oncosupresores reprimidos por Cdc42 en la línea SW620.** Utilizando la bibliografía proporcionada por NCBI e IPA, se seleccionaron 21 genes que se han identificado como genes supresores tumorales en al menos un tipo tumoral

### **5.5 Reexpresión de los posibles genes supresores tumorales, TWIST1, CACNA2D2, CBS, ID4 y KIAA1456 por el silenciamiento de Cdc42 en la línea SW620.**

Hasta la fecha, no existen evidencias de que Cdc42 provoque el silenciamiento transcripcional de genes oncosupresores para favorecer el proceso carcinogénico. Esta posible y novedosa función de Cdc42 se quiso estudiar con mayor profundidad, ya que entre otras razones, durante el desarrollo del cáncer colorrectal la alteración genética más predominante es la desactivación de genes supresores tumorales (Fearon & Vogelstein, 1990). Por tanto, se estableció la hipótesis de que Cdc42 podría ser el causante de muchos de estos silenciamientos.

Como punto de partida se procedió a validar el dato obtenido de los microarrays de 5 de los genes que se reprimían en presencia de Cdc42 (Tabla 6): TWIST1, CACNA2D2, CBS, ID4 y KIAA1456. Como se puede observar en la Tabla 6, para los genes CBS, ID4 y KIAA1456 ya ha sido previamente descrito su papel como genes oncosupresores en el tipo tumoral de colon. El proceso de validación se llevó a cabo por la técnica de RT-PCR semicuantitativa, para algunos genes (Figura 13A) y por PCR a tiempo real para todos los casos (Figura 13B). El resultado confirma lo observado en los microarrays: la disminución de los niveles de Cdc42 aumenta la expresión transcripcional de estos cinco genes de una forma dependiente de la dosis (Figura 13). Exceptuando el caso de CBS, se podría considerar que incluso se produce una reexpresión total, ya que para los genes CACNA2D2 e ID4, la PCR a tiempo real amplificaba en ciclos muy tardíos (más de 30), significando que los niveles transcripcionales basales de la línea parental SW620 son muy bajos. Para el caso de KIAA1456 y TWIST1, la línea parental no expresa este gen, indicando que la pérdida parcial pero significativa de Cdc42 produce la reactivación transcripcional de este gen. Este hecho se puede observar en la RT-PCR semicuantitativa para los genes CACNA2D2, ID4 y KIAA1456 (Figura 13A). Los transfectantes estables para la discreta sobreexpresión de Cdc42 no presentaban apenas diferencias con la línea parental, sólo para el caso del gen ID4 donde se pasa de una baja expresión de la línea parental a un silenciamiento total en los clones wt1 y wt2 (Figura 13B).



**Figura 13. Validación de los microarrays de los genes TWIST1, CACNA2D2, CBS, ID4 y KIAA1456, alterados por la expresión de Cdc42.** El ARN total extraído de los clones i1, i2, wt1 y wt2 y la línea SW620, se retro-transcribió y se utilizó para ensayos de PCR. **A)** RT-PCR semicuantitativa de los genes CACNA2D2, ID4 y KIAA1456. Como control interno se utilizó la expresión del gen GAPDH. **B)** La PCR cuantitativa de los 5 genes alterados por Cdc42 en la línea SW620 fue llevada a cabo tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los genes utilizados como controles internos fueron  $\beta$ -2 microglobulina para los casos de CBS, ID4 y KIAA1456, y el ARN ribosomal 18S para los casos de TWIST1 y CACNA2D2. Los datos se representan como el  $\log_{10}RQ$ , donde los valores de expresión superiores a la línea parental (cuyo valor de referencia es cero) son positivos y los valores menores son negativos. La desviación estándar se representa como  $\log_{10}(RQ_{\max}) - \log_{10}(RQ)$ . El asterisco indica que no hay expresión del gen en la muestra analizada.

Debido a que el incremento de los niveles basales de Cdc42 en los clones generados es muy bajo y que la línea celular SW620 ya es una línea tumoral con expresión de Cdc42, se consideró que la disminución de los niveles de Cdc42 sería el aspecto que podría aportar mayor información al estudio. Por ello, se planteó la hipótesis de que la ausencia de Cdc42

es capaz de hacer a esta línea celular menos agresiva en el ámbito de la biología tumoral. Consecuentemente, para continuar este estudio se incluyó un clon más del grupo de interferencia de Cdc42, i3, cuyos niveles de Cdc42 eran muy similares al clon i1, es decir presentaba una fuerte disminución de la expresión de esta GTPasa Rho. En este tercer clon, al igual que en los clones i1 e i2, se comprobó que se producía la reexpresión de los 5 genes validados (datos no mostrados).

## **5.6 Estudio del mecanismo de regulación transcripcional mediado por Cdc42 de los posibles genes supresores tumorales TWIST1, ID4, CACNA2D2 y KIAA1456**

Hasta la fecha se ha descrito que Cdc42 media la regulación transcripcional por su relación con factores de transcripción como STAT3, NFκB y SRF (Alberts *et al.*, 1998; Benitah *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2008), pero no existen evidencias de que lo pueda hacer por otros mecanismos alternativos de silenciamiento transcripcional. Los mecanismos de supresión tumoral más frecuentes en el desarrollo de CCR son las mutaciones inactivantes, LOH e hipermetilación de promotores (Kinzler & Vogelstein, 1996; Lind *et al.*, 2004; Toyota *et al.*, 1999). Se ha descrito que muchos de los genes que se encuentran reprimidos por Cdc42 en este estudio, son inactivados a través de la hipermetilación de sus promotores en diversos tipos tumorales (Tabla 7). En concreto, 4 de los 5 genes validados, TWIST1, CACNA2D2, ID4, KIAA1456, se pueden silenciar por hipermetilación de sus promotores (Tabla 7). Consecuentemente, se investigó si Cdc42 estaba mediando dicho silenciamiento por inactivación epigenética.

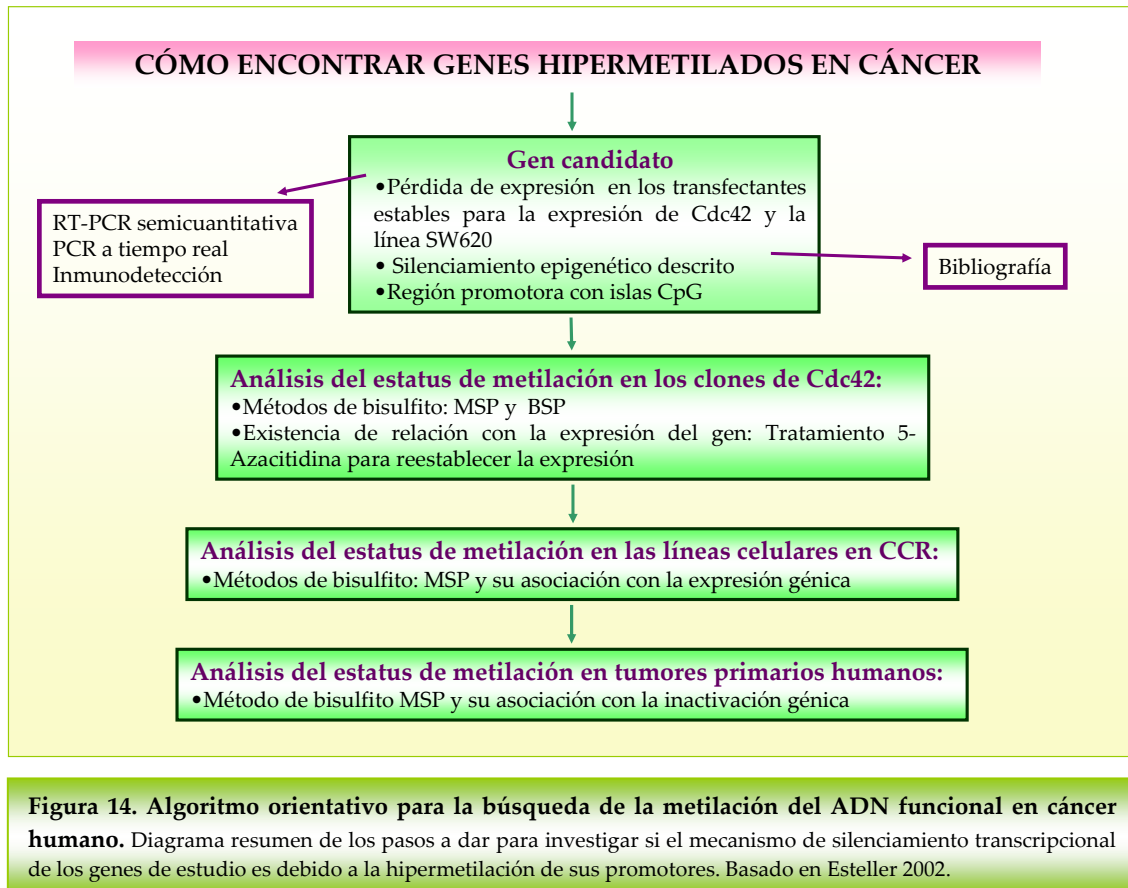


Símbolo del gen	Nombre del gen	Descripción	Silenciamiento epigenético en cáncer
MAFB	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)</i>	Factor de transcripción básico de cremallera de leucina (bZIP) que juega un papel fundamental en la regulación de la hematopoyesis específica de linaje. La proteína nuclear codificada reprime la transcripción de genes específicos de linaje eritroide mediada por ETS1 en células mieloides.	Leucemia mieloide aguda (Gebhard <i>et al.</i> , 2006)
DLX5	<i>distal-less homeobox 5</i>	Miembro de la familia de factores de transcripción homeobox similar al gen de <i>Drosophila</i> menor-distal. Juega un papel fundamental en el desarrollo de huesos y en la curación de fracturas. Una mutación de este gen podría estar asociada con malformaciones en manos y pies.	Cáncer de colon (Model <i>et al.</i> , 2007) Leucemia linfoblástica crónica (Rush <i>et al.</i> , 2004)
SEMA6A	<i>semaphorin 6A-1</i>	Podría actuar como señal de repulsión para la guía axonal. Podría desempeñar un papel en la canalización de los axones en los canales simpáticos y en el control de la secuencia temporal de este tipo de inervación.	Leucemia (Yu <i>et al.</i> , 2005)
Twist1	<i>twist homolog 1</i>	Factor de transcripción básico hélice-bucle-hélice (bHLH) que se ha implicado en diferenciación y determinación del linaje celular. Se han encontrado mutaciones de este gen en pacientes con el síndrome de Saethre-Chotzen.	Cáncer de mama (Fackler <i>et al.</i> , 2003 y 2004) Cáncer gástrico (Kang <i>et al.</i> , 2008) Cáncer de cuello de útero (Sova <i>et al.</i> , 2006) Cáncer de pulmón (Tsou <i>et al.</i> , 2007) Neuroblastoma (Abe <i>et al.</i> , 2008)
CACNA2D2	<i>calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2</i>	Proteína que forma parte de complejos de canal de calcio dependiente de voltaje. Miembro de la familia de subunidades alfa-2/delta. Los canales de calcio median el flujo de iones de calcio en el interior celular a través de la membrana polarizada y consisten en un complejo de subunidades alfa1, alfa2/delta, beta y gamma en una relación 1:1:1.	Cáncer de pulmón (Ji <i>et al.</i> , 2005) Glioma (Hesson <i>et al.</i> , 2004) Cáncer nasofaríngeo (Chow <i>et al.</i> , 2004)
PCDHGC3	<i>protocadherin gamma subfamily C, 3</i>	Miembro del grupo de genes protocadherina gamma. Este grupo tiene una organización tipo inmunoglobulinas, sugiriendo un nuevo mecanismo de su regulación y expresión. Juegan un papel fundamental en el establecimiento de conexiones célula-célula en el cerebro.	Inducción de expresión tras tratamiento con TSA en fibroblastos transformados con v-fos (MacGarry <i>et al.</i> , 2004)
NEFM	<i>neurofilament, medium polypeptide 150kDa</i>	Proteína de neurofilamentos medios, los cuales juegan un papel crucial en el transporte intracelular a los axones y dendritas. Esta proteína se utiliza como biomarcador de daño neuronal.	Cáncer de páncreas (Hagihara <i>et al.</i> , 2004)
ID4	<i>inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	Proteína hélice-bucle-hélice inhibidora de la unión al ADN. Es capaz de heterodimerizar con los factores de transcripción básico hélice-bucle-hélice (bHLH) para reprimir la transcripción de genes específicos de tejido	Adenocarcinoma gástrico (Chan <i>et al.</i> , 2003) Cáncer de colon (Umetani <i>et al.</i> , 2004) Leucemia (Yu <i>et al.</i> , 2005) Linfoma (Hagiwara <i>et al.</i> , 2007) Cáncer de mama (Noetzel <i>et al.</i> , 2008) Colangiocarcinoma (Uhm <i>et al.</i> , 2008) Cáncer de esófago (Smith <i>et al.</i> , 2008)
C8orf79-KIAA1456	<i>chromosome 8 open reading frame 79</i>	Proteína de función desconocida que posee un dominio metiltransferasa.	Cáncer de colon (Flanagan <i>et al.</i> , 2004)

**Tabla 7. Lista de genes oncosupresores tumorales reprimidos por Cdc42 cuyo silenciamiento transcripcional puede ser debido a un mecanismo epigenético.**

Los pasos a seguir para investigar si los genes candidatos tienen una regulación epigenética es estudiar si la metilación es funcional, esto normalmente se asume al observar que la hipermetilación de islas CpG en la región promotora se asocia con el silenciamiento transcripcional (Figura 14). Para ello, es necesario comprobar la pérdida de expresión a través de las técnicas de RT-PCR o inmunodetección y estudiar sus regiones promotoras para detectar si en su promotor proximal existen islas CpG. Para la detección de las regiones promotoras proximales si no es posible basarse en la referencias bibliográficas donde se describen se recurre a la base de datos *Ensembl* y se observa si existen regiones CpG en la zona por delante de la región 5' del gen de estudio, que suele ser la región promotora más probable. Otra buena forma de localizar esta zona clave es conociendo los principales lugares de inicio de la transcripción del ARN de cada uno de los genes. Además, otra manera de comprobar si un gen que no se expresa se regula por hipermetilación de su promotor, es reactivando su expresión mediante el tratamiento con fármacos de

desmetilación general como es 5-Azacitidina. Sin embargo, esto no supone una prueba definitiva de la asociación directa entre metilación y silenciamiento, ya que este fármaco puede inducir la reexpresión génica de una forma indirecta, por ejemplo dañando a la célula o estimulando la expresión de un activador transcripcional que estuviese realmente metilado. Por tanto, la única forma de obtener una demostración definitiva de este tipo de regulación transcripcional es por el análisis de estado de metilación de las islas CpG de los promotores de cada gen (Esteller, 2002).



Como regla general, la metilación de islas CpG debe estudiarse primero en líneas celulares, donde la disposición de material es ilimitada, mediante el uso de métodos basados principalmente en la modificación con bisulfito del ADN: PCR específica de metilación (MSP) (Herman *et al.*, 1996) y PCR y secuenciación tras modificación con bisulfito (BSP) (Clark *et al.*, 1994). Estas dos técnicas se han explicado con detalle en la sección de Materiales y Métodos. Por tanto, para el estudio de la posible hipermetilación en los promotores de los genes de estudio, se comenzaría por los transfectantes estables para la expresión de Cdc42, en los que se detectó la reexpresión y silenciamiento de los genes candidatos a estudiar. Adicionalmente, sería posible realizar estudios complementarios de reexpresión de dichos genes tras el tratamiento con 5-Azacitidina en la línea SW620. A

continuación, si la hipótesis se confirma, estos estudios se ampliarían con otras líneas celulares de cáncer colorrectal para comprobar si se trata de un mecanismo general de silenciamiento en CCR mediante el análisis por MSP. Finalmente estos resultados se llevarían a la clínica, al análisis en muestras clínicas, para estudiar su relevancia en pacientes, la técnica idónea para el amplio análisis de un gran número de muestras sería la MSP (Figura 14), aunque es posible aplicar otras técnicas para poder obtener resultados más cuantitativos.

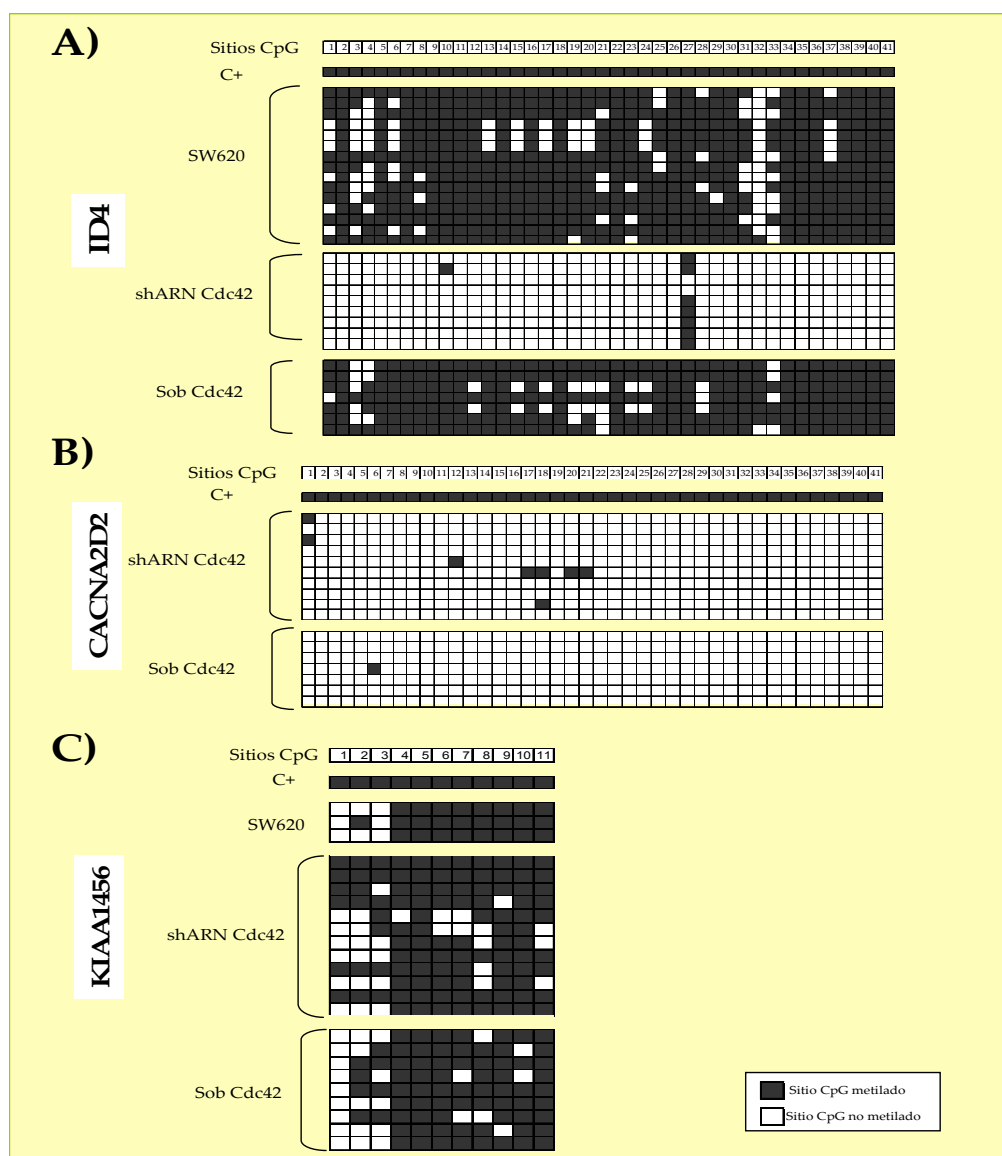
Para determinar si el silenciamiento transcripcional de los genes TWIST1, CACNA2D2, ID4 y KIAA146 era debido a la hipermetilación de sus promotores, se utilizaron los métodos de MSP y/o BSP. Como control externo adicional de la metodología usada se incluyó el análisis del estado de metilación de los genes p16INK4a y MGMT, ya que son genes que se encuentran comúnmente metilados en cáncer colorrectal y en concreto, en la línea SW620 (Cheng *et al.*, 2006; Lind *et al.*, 2004). Las secuencias de TWIST1, ID4, p16INK4a y MGMT analizadas por MSP se localizaban en una zona rica en islas CpG englobando la región 5' no codificante de los correspondientes genes. La metilación aberrante de estas regiones ya ha sido previamente asociada con el silenciamiento transcripcional (Fackler *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 2004; Umetani *et al.*, 2004). Como se muestra en la Figura 15, la línea celular SW620 presentaba metilada la región promotora analizada para todos los genes, TWIST1, ID4, p16INK4a y MGMT. Las células SW620 transfectadas de forma estable con el shARN de Cdc42 (i1, i2, i3), presentaban bandas positivas tanto para el patrón metilado (M) como para el no metilado (U) en los genes TWIST1, ID4 y p16INK4a. Por otro lado, las células transfectadas de forma estable con el plásmido de expresión de la forma salvaje de Cdc42 (wt1 y wt2), daban sólo banda positiva para el patrón M en todos los genes. De nuevo, los clones para la moderada sobreexpresión de Cdc42 no presentaban diferencias con respecto de la línea celular parental SW620. Sin embargo, las células con los niveles reducidos de Cdc42 presentaban ambas bandas de ADN metilado y no metilado para los genes TWIST1, ID4 y, sorprendentemente, p16INK4a, lo cual podría explicar porqué estas células han recuperado la expresión de los genes de estudio (Figura 13). El caso de p16INK4a se estudiará en apartados posteriores.



**Figura 15. PCR específica de metilación (MSP) de los promotores de los genes TWIST1, ID4, p16INK4a y MGMT en los transfectantes estables para niveles diferenciales de Cdc42, derivados de la línea SW620.** El ADN extraído de las células establemente transfectadas y de SW620 fue modificado con bisulfito sódico y amplificado por PCR usando un par de cebadores diseñados para distinguir específicamente la forma metilada (M) de la no metilada (U). El tamaño de los productos de PCR se indica en la Tabla 3. Se usaron tres controles, un ADN genómico comercial de varón metilado en su totalidad de forma artificial (*CpGenome™ Universal Methylated DNA*) como control de metilación (C+); ADN de sangre periférica de donantes sanos como control de no metilación (Cneg) y H<sub>2</sub>O como control de no contaminación de las PCRs.

El estado de metilación de ID4 fue confirmado por BSP en estas mismas muestras (Figura 16A). Los cebadores para la BSP de ID4 (Tabla 3) amplificaban una región que englobaba un mayor número de islas CpG que la MSP y contenía el promotor mínimo proximal (Pagliuca *et al.*, 1998). Consistentemente con los resultados de la MSP, la gran mayoría de los 41 sitios CpG examinados estaban metilados en la línea SW620. En los clones de interferencia de Cdc42 estos 41 sitios CpG estaban completamente no-metilados, excepto el sitio 27, por último las células que sobreexpresaban Cdc42 presentaban una sutil diferencia con respecto de la línea celular parental, con algún sitio más metilado (Figura 16A).

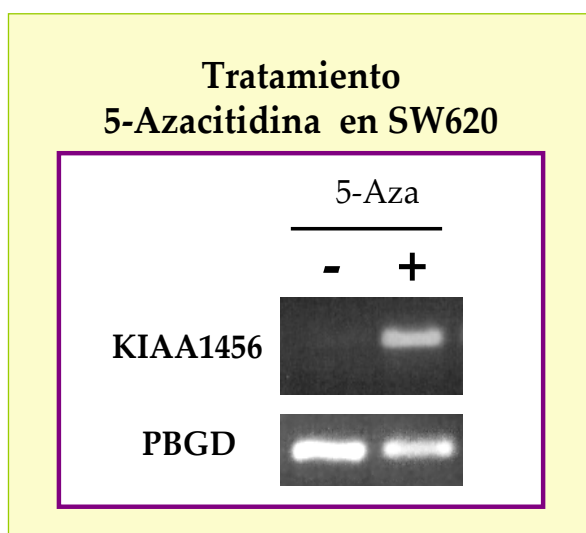
En el análisis de la región promotora 5' del gen CACNA2D2 se identificaron islas CpG. Este gen se ha encontrado hipermetilado en glioma (Hesson *et al.*, 2004) y en líneas celulares de cáncer nasofaríngeo (Chow *et al.*, 2004). Cuando el estado de metilación de dicho promotor fue examinado por BSP, no se encontraron diferencias entre las células que sobreexpresaban o interferían Cdc42, ya que prácticamente todos los 41 sitios CpG examinados se encontraban no metilados (Figura 16B). Este resultado descarta la posibilidad de que Cdc42 regule la expresión transcripcional de CACNA2D2 a través de un mecanismo epigenético.



**Figura 16. PCR y secuenciación tras modificación con bisulfito (BSP) de los promotores de los genes ID4, CACNA2D2 y KIAA1456 en los transfectantes estables para niveles diferenciales de Cdc42 derivados de la línea SW620.** El ADN extraído de las células establemente transfectadas y de SW620 fue modificado con bisulfito sódico y amplificados por PCR usando un par de oligos que reconocen indistintamente tanto la forma metilada como no metilada del ADN (Tabla 3). Estos productos de PCR fueron clonados y finalmente secuenciados. El grado de metilación de cada dinucleótido CpG se obtuvo a partir de varios clones individuales de los que se muestran ejemplos representativos de cada grupo: las células SW620, los clones de interferencia de Cdc42 (shARN de Cdc42) y los clones de sobreexpresión (Sob Cdc42). Los sitios CpG metilados se indican con el color negro mientras que los cuadrados de color blanco indican sitios CpG no metilados. Como control positivo (C+) se secuenció un ADN genómico comercial modificado con bisulfito que había sido previamente metilado en su totalidad de forma artificial (CpGenome™ Universal Methylated DNA). **A)** BSP del promotor proximal del gen ID4 donde se analizan 41 sitios CpG. **B)** BSP de la región promotora de CACNA2D2 donde se encuentran englobados 41 sitios CpG. **C)** BSP de la región promotora de KIAA1456 que presenta 11 sitios CpG.

En el caso del gen KIAA1456, se ha descrito que el tratamiento con el agente desmetilante 5-Azacidina de la línea SW620, produce una reexpresión del gen, sugiriendo que la metilación puede estar controlando la expresión de KIAA1456 en SW620 (Flanagan *et al.*, 2004). Se confirmó que el tratamiento de la línea SW620 con 5-Azacidina

reexpresaba el gen, comparado con la línea sin tratar (Figura 17). Para analizar si Cdc42 podría estar ejerciendo la represión de este gen a través de un mecanismo epigenético, se investigó la región promotora del gen KIAA1456, la cual contiene 11 dinucleóticos CpG a 450 pb por delante del codón de iniciación. El análisis de esta región por BSP reveló que, tras la modulación de los niveles de Cdc42, los cambios en el estado de metilación de los 11 sitios CpG examinados, eran independientes de la presencia Cdc42 (Figura 16C). Esto indica que la reexpresión de KIAA1456 por la reducción de los niveles de Cdc42 no es debida a una modificación epigenética directa del promotor.



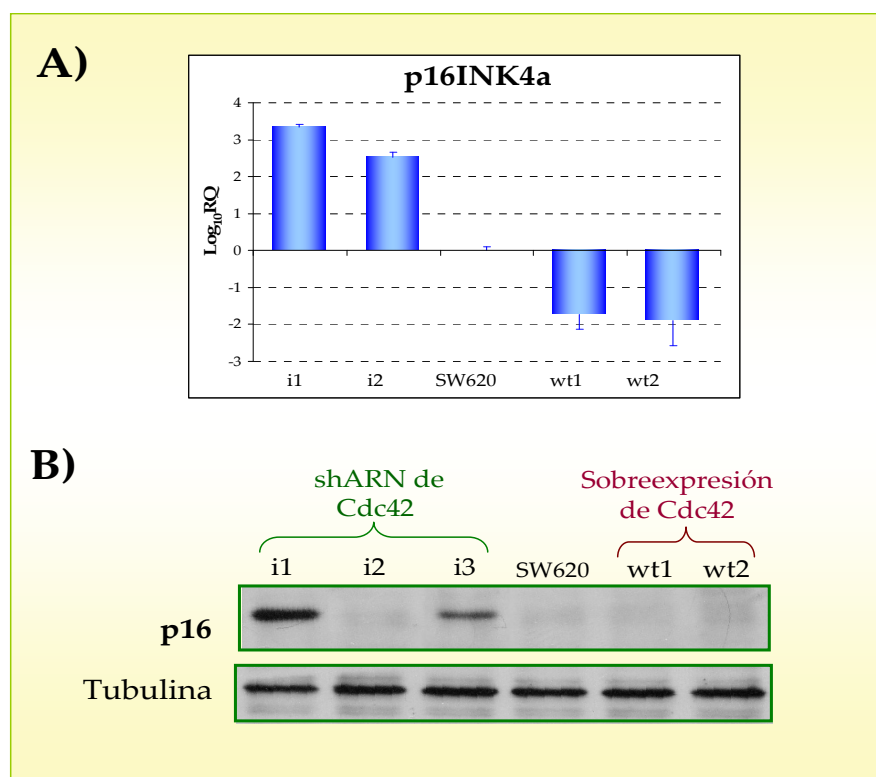
**Figura 17. Tratamiento de 5-Azacidina en la línea celular SW620.** La línea celular SW620 fue tratada con el inhibidor de DNMTs, 5-Azacidina (5-Aza) a una concentración final de 5 µg/ml durante 3 días. Se realizó el mismo procedimiento para las células control a las cuales se les añadió PBS en lugar de 5-Aza. A partir de ARN extraído de dichas líneas sin tratar (-) y tratada (+) con el inhibidor, se realizó una RT-PCR semicuantitativa para comprobar la reexpresión del gen KIAA1456. La expresión del gen PBGD se usó como control interno.

Como conclusión, Cdc42 regula la expresión de los genes ID4 y TWIST1 por un mecanismo de metilación de sus respectivos promotores, mientras que la expresión de los genes CACNA2D2 y KIAA1456 es regulada por Cdc42 a través de mecanismos de regulación transcripcional desconocidos, descartando la metilación de sus promotores.

## 5.7 Cdc42 regula la transcripción de p16INK4a en la línea SW620

Para validar en nuestro sistema celular de SW620 que la modulación del grado de metilación del promotor del gen p16INK4a por Cdc42 era funcional, se realizaron tanto ensayos de PCR a tiempo real como de inmunodetección (Figura 18). Los resultados de la Figura 18A muestran que los clones de interferencia de Cdc42 expresan el gen p16INK4a comparado con la línea SW620. Sin embargo, sólo los clones i1 e i3, cuyos niveles de Cdc42 se encontraban más reducidos que el clon i2, presentaban una elevada expresión a nivel de proteína, en cambio el clon i2 no presentaba niveles apreciables de proteína p16 (Figura 18B). La línea SW620 presentaba una expresión transcripcional de p16INK4a muy baja pero inapreciable a nivel de proteína, mientras que los clones de sobreexpresión de Cdc42 (wt1 y wt2) presentaban menores niveles de ARNm que la línea SW620 pero igual

de inapreciables que la línea parental a nivel de proteína (Figura 18A y B). Estos resultados, por tanto, están en consonancia con lo observado a nivel de metilación del promotor del gen oncosupresor p16INK4a.



**Figura 18. Cdc42 regula la expresión de p16INK4a en la línea celular SW620. A)** El ARN total extraído de los clones i1, i2, wt1 y wt2 y la línea SW620, se retro-transcribió y se utilizó para ensayos de PCR cuantitativa del gen p16INK4a tal y como se detalla en Materiales y Métodos. El gen utilizado como control interno fue  $\beta$ -2 microglobulina. Los datos se representan como el log<sub>10</sub> RQ, donde los valores de expresión superiores a la línea parental (cuyo valor de referencia es cero) son positivos y los valores menores son negativos. La desviación estándar se representa como log<sub>10</sub>(RQ<sub>max</sub>) - log<sub>10</sub>(RQ). **B)** Los extractos de proteína total procedentes de los clones estables (i1, i2, i3, wt1 y wt2) y la línea SW620, se resolvieron en una PAGE-SDS al 15% y fueron transferidos a membranas de PVDF. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo específico contra la proteína p16. Como control interno se utilizaron los niveles de expresión de tubulina. shARN: horquilla de ARN de interferencia.

Igualmente, se analizó la expresión transcripcional de MGMT, en los distintos grupos de SW620 de sobreexpresión o interferencia de Cdc42 por PCR a tiempo real. Como resultado de este análisis, no se observó una diferencia significativa en la expresión entre dichos grupos (datos no mostrados). Esto concuerda con los resultados obtenidos del estado de metilación del promotor, el cual se encuentra metilado independientemente de los niveles de Cdc42 (Figura 16C).

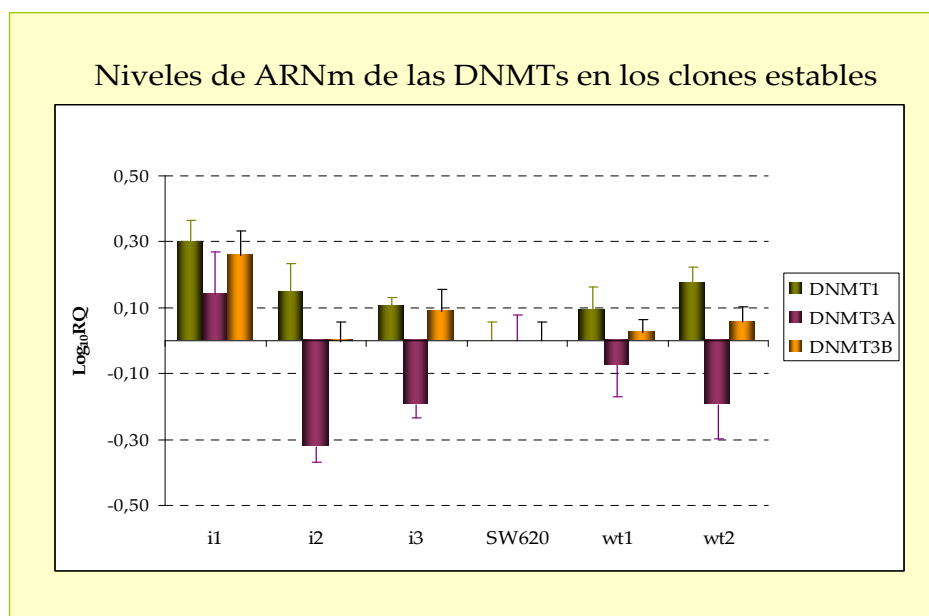
Consecuentemente Cdc42 no regula la expresión transcripcional del gen oncosupresor MGMT en la línea SW620 pero sí del gen supresor tumoral p16INK4a.

## 5.8 Estudio del mecanismo de regulación epigenética mediada por Cdc42. Expresión transcripcional de las DNMTs

Durante los últimos 20 años, los avances en la señalización celular han permitido caracterizar los componentes implicados en la transmisión de señales. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual las islas CpG se hipermetilan de forma específica en promotores de genes oncosupresores para dar lugar a un silenciamiento transcripcional, permanece sin resolver. Una de las hipótesis que se baraja para este tipo de regulación es que es un proceso específico de un gen o un grupo de genes. El hallazgo novedoso de que Cdc42, un posible oncogen en cáncer colorrectal, pudiera ser el responsable del silenciamiento epigenético de un grupo de al menos tres genes, TWIST1, ID4 y p16INK4a, nos llevó a tratar de dilucidar los pasos moleculares de este tipo de regulación. En este contexto, estudios previos demostraban que los oncogenes FOS y RAS incrementaban la expresión de la DNMT1 (Ordway *et al.*, 2004). Se ha demostrado que en fibroblastos de ratón, Cdc42 estimula y contribuye en la transformación mediada por Ras *in vitro* (Qiu *et al.*, 1997). Además, el análisis del promotor de DNMT1 ligaba a este gen con la señalización vía c-jun (Bigey *et al.*, 2000), ruta que se ha relacionado con la regulación transcripcional mediada por las GTPasas Rho (Benitah *et al.*, 2004). Asimismo, ha sido ampliamente descrita la sobreexpresión de las DNMTs como un evento frecuente en cáncer (Jones & Baylin, 2002). Por tanto se propuso como primera hipótesis que Cdc42 podría regular el silenciamiento epigenético de dichos genes a través de la modulación de los niveles de las DNMTs. Para ello, se analizaron, en los transfectantes estables para la interferencia de Cdc42, (i1, i2 e i3), la línea SW620 y los transfectantes para la sobreexpresión de Cdc42 (wt1 y wt2), los niveles transcripcionales de las 3 DNMTs que se han implicado más en la metilación aberrante de promotores, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B (Jones & Baylin, 2002). A pesar de no encontrarse diferencias de expresión de estas tres enzimas en los microarrays, se quiso validar este dato por PCR cuantitativa para descartar posibles artefactos. Los resultados de la PCR a tiempo real confirmaban que no existían diferencias de expresión dependientes de los niveles de Cdc42, ya que en algunos casos era variable entre clones del mismo grupo de interferencia o sobreexpresión (Figura 19). Estas variaciones eran discretas, ya que exceptuando el caso de la DNMT1 para i1 y DNMT3B para i2, los cambios son menores de dos veces ( $\text{Log}_{10} \text{RQ} < \pm 0,3$ ). Estos resultados indican que Cdc42 no regula el silenciamiento epigenético a través de la modulación de los niveles de ARNm de DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Asimismo, en los microarrays la expresión



de otros componentes del complejo de metilación, como las distintas HDACs y MBPs no presentaban diferencias entre los grupos de sobreexpresión e interferencia de Cdc42 sugiriendo que tampoco su expresión transcripcional estaba siendo alterada por la presencia de Cdc42 (datos no mostrados). En el apartado de discusión se tratarán otros posibles mecanismos de regulación epigenética con mayor detalle.



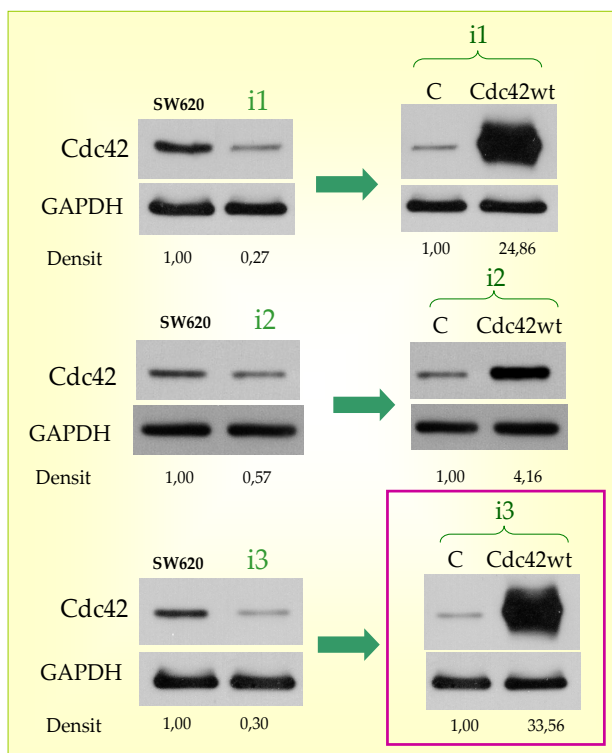
**Figura 19. Niveles de expresión del ARNm de DNMT1, DNMT3A y DNMT3B en los clones estables para la expresión diferencial de Cdc42 derivados de la línea SW620.** El ARN total extraído de los clones i1, i2, i3, wt1 y wt2 y la línea SW620, se retro-transcribió y se utilizó para ensayos de PCR cuantitativa de los genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B tal y como se detalla en Materiales y Métodos. El gen utilizado como control interno fue GAPDH. Los datos se representan como el  $\log_{10}RQ$ , donde los valores de expresión superiores a la línea parental (cuyo valor de referencia es cero) son positivos y los valores menores son negativos. La desviación estándar se representa como  $\log_{10}(RQ_{\max}) - \log_{10}(RQ)$ .

## 5.9 Reversión del fenotipo en los clones de interferencia de Cdc42

Complementariamente a estos resultados, se investigaron los efectos transcripcionales producidos al sobreexpresar transitoriamente la forma salvaje de Cdc42 (Cdc42wt) en los clones de interferencia de Cdc42. Debido a que la sobreexpresión estable significativa de Cdc42 no es posible en el modelo celular seleccionado, y a que los niveles basales de los 5 genes analizados eran muy bajos, estos datos establecerían, de una forma más sólida, la regulación transcripcional mediada por Cdc42 de los 5 genes seleccionados, TWIST1, ID4, CACNA2D2, KIAA1456 y p16INK4a.

Por tanto, los clones para la interferencia de Cdc42 (i1, i2 e i3), fueron transfectados de forma transitoria con el vector de expresión de la forma salvaje de Cdc42 (Cdc42wt) como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. Transcurridas 48 horas, se extrajeron

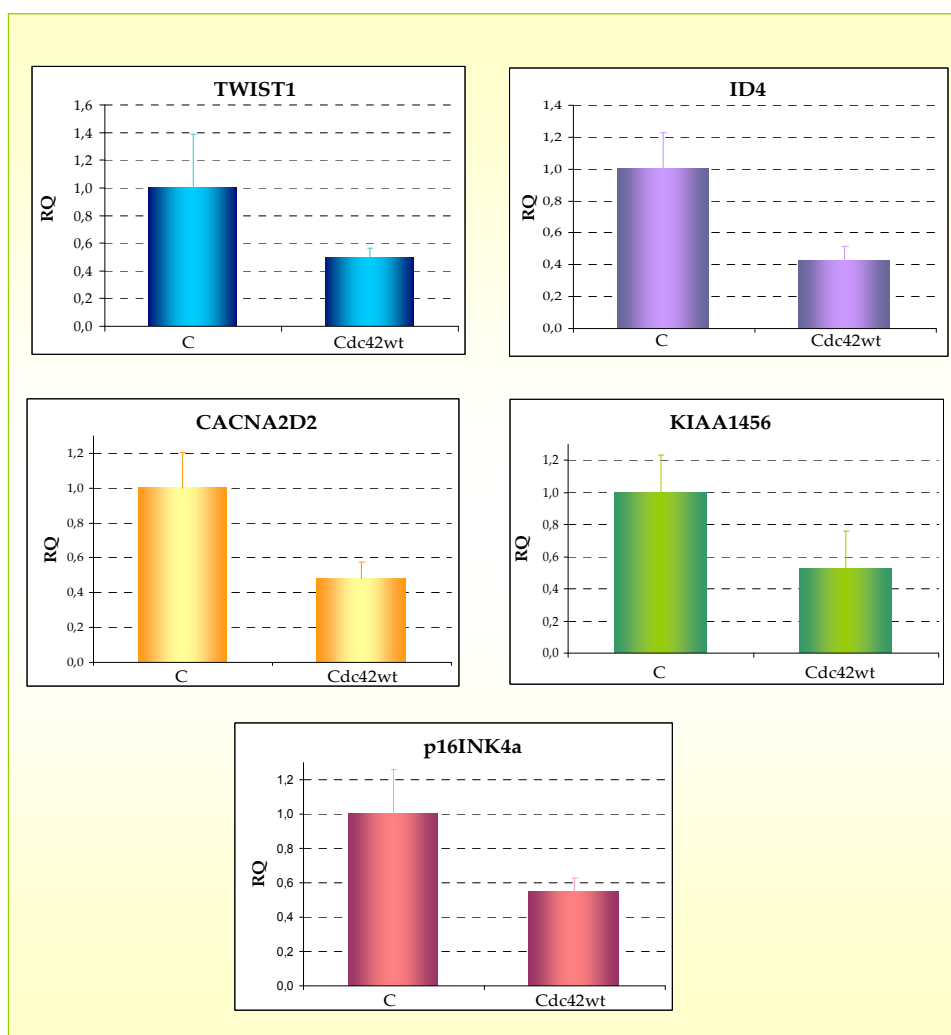
la proteína total de los distintos transfectantes y se realizó un ensayo de inmunodetección para comprobar el grado de sobreexpresión de Cdc42 obtenido. Como se muestra en la Figura 20, para los clones i1 e i3 se obtuvo una sobreexpresión de 24,86 y 33,56 veces respectivamente, comparada con el vector vacío. El i2 adquirió un incremento menor, de 4,16 veces.



**Figura 20. Sobreexpresión transitoria de Cdc42 en los clones de interferencia estable de Cdc42 derivados de la línea SW620.** Las líneas celulares con los niveles disminuidos de Cdc42 de forma estable derivadas de SW620 (i1, i2 e i3), se transfectaron con el vector de expresión de la forma salvaje de Cdc42 (Cdc42wt) o con el vector vacío (C) tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Tras 48h, los extractos de proteína total procedentes de dichos clones estables (i1, i2, i3) transfectados con el vector vacío o con el vector Cdc42wt y la línea SW620, se resolvieron en una PAGE-SDS al 15% y fueron transferidos a membranas de PVDF. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo específico contra la proteína Cdc42. Los niveles de expresión de Cdc42 se densitometraron y normalizaron con GAPDH. El interferente i3 fue seleccionado para el posterior estudio transcripcional (recuadro rosa). Densit=densitometría

Se seleccionó el clon i3 para su posterior análisis transcripcional por ser el clon donde se había obtenido el mayor grado de sobreexpresión transitoria de Cdc42. Para ello se extrajo el ARN total de dicho clon transfectado con Cdc42wt o con el vector vacío, y se realizaron las distintas PCRs a tiempo real de los genes TWIST1, ID4, CACNA2D2, KIAA1456 y p16INK4a. Como se puede observar en la Figura 21, tras la sobreexpresión transitoria de Cdc42 los 5 genes analizados disminuían los niveles de expresión transcripcional de una forma discreta, sugiriendo que para observar cambios de expresión mayores es necesaria una sobreexpresión de Cdc42 estable en el tiempo.

Estos resultados confirman que Cdc42 disminuye la expresión transcripcional de los posibles genes supresores en cáncer colorrectal, TWIST1, ID4, CACNA2D2, KIAA1456 y p16INK4a.



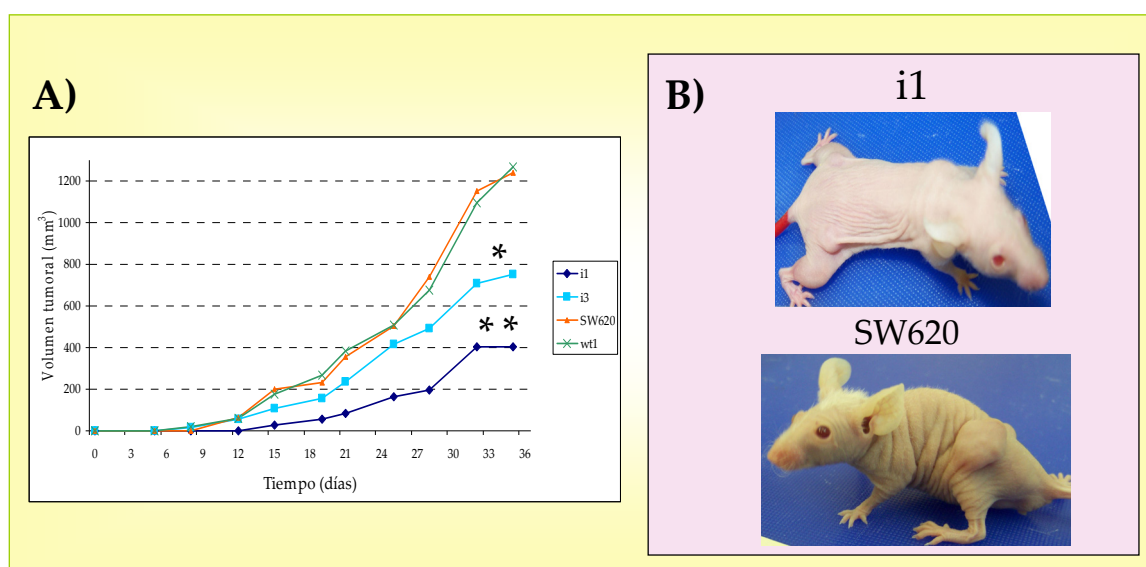
**Figura 21.** La sobreexpresión transitoria de Cdc42 disminuye los niveles de ARNm de los genes TWIST1, ID4, CACNA2D2, KIAA1456 y p16INK4a en la línea celular estable para la interferencia de Cdc42 derivada de SW620. El ARN total extraído de las células i3 procedentes de la transfección transitoria con la forma salvaje de Cdc42 (Cdc42wt) o el correspondiente vector vacío (C) se retro-transcribió y se utilizó para ensayos de PCR cuantitativa de los genes TWIST1, ID4, CACNA2D2, KIAA1456 y p16INK4a tal y como se indica en Materiales y Métodos. El gen utilizado como control interno fue ARN ribosomal 18S. Los datos se representan como "RQ", donde los valores de expresión superiores a la línea transfectada con el vector vacío (cuyo valor de referencia es 1) son mayores de 1 y los valores de expresión menor son inferiores a 1. La desviación estándar se representa como  $RQ_{max}-RQ$ .

### 5.10 La disminución de los niveles de Cdc42 es determinante en la velocidad del crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos

Con el objetivo de responder la pregunta de si la ausencia de Cdc42 es determinante en la biología tumoral de la línea SW620 se probó su efecto en la generación y crecimiento de tumores *in vivo*, en ratones atímicos (*BALB/c Nude*). Para este experimento se amplificaron en cultivo los dos clones de interferencia de Cdc42, con los niveles de esta GTPasa más reducidos, es decir i1 e i3, la línea SW620 como control y uno de los clones de sobreexpresión de Cdc42 (wt1). Debido a que los resultados de validación entre la línea

control y los clones de sobreexpresión no presentaban diferencias significativas se pensó que en el modelo *in vivo* no aportarían datos nuevos con respecto a la línea parental control, por ello se eligió sólo uno de los clones de sobreexpresión.

Los ratones fueron monitorizados durante 35 días después de la inyección para controlar el crecimiento de los tumores dos veces por semana. Como resultado de este seguimiento se observó que la tasa de crecimiento tumoral de ambos transfectantes estables para la interferencia de Cdc42 (i1 e i3) era significativamente menor con respecto a la tasa presentada tanto por la línea control SW620, como por el clon wt1 ( $p=0,004$ ,  $p=0,010$ , respectivamente). Mientras que estos últimos alcanzaron tamaños tumorales medios de 1,24 y 1,27  $\text{cm}^3$  respectivamente, los tumores originados por los clones interferentes i1 e i3, adquirieron, en el período estudiado, un tamaño medio de 0,40 y 0,75  $\text{cm}^3$ , respectivamente, lo que supone una reducción de alrededor de 3 veces para el clon i1 y de 1,6 veces para el clon i3 con respecto a la línea parental control (Figura 22).

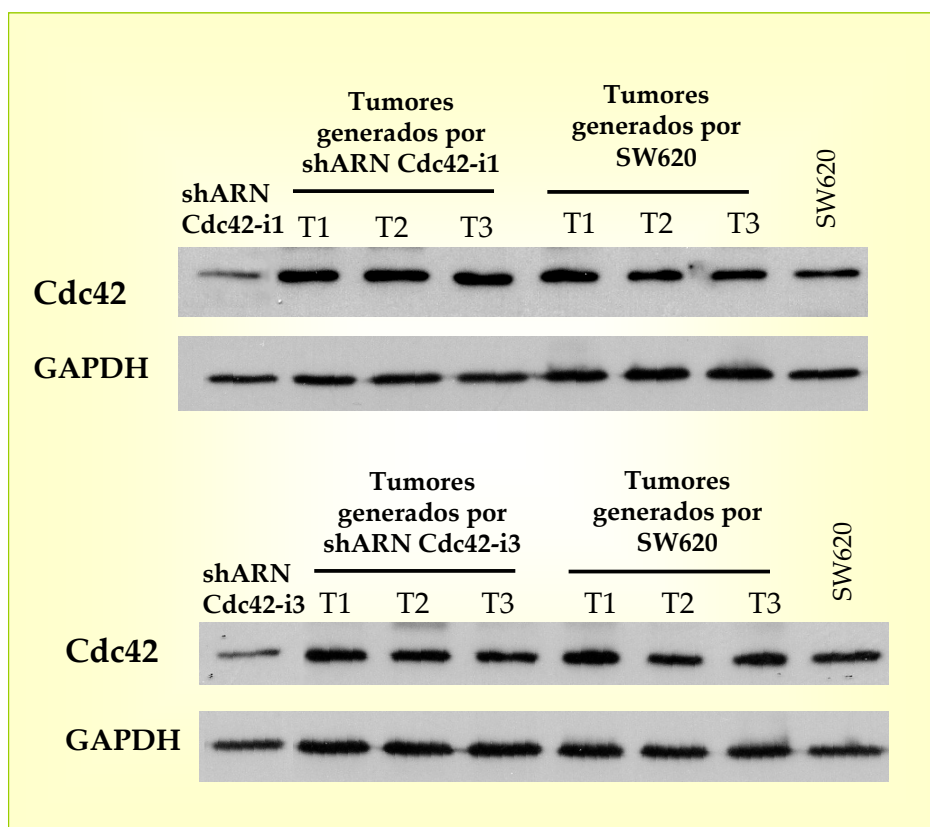


**Figura 22. Tasa de crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos de los clones de expresión diferencial de Cdc42.** Se inocularon subcutáneamente en el lomo de ratones atímicos (*BALB/c Nude*)  $10^6$  células de cada grupo seleccionado: los clones de interferencia i1 e i3, el clon de sobreexpresión de Cdc42, wt1, y la línea celular SW620. El tamaño de los tumores generados fue medido dos veces por semana durante 35 días. **A)** Comparación del crecimiento de los tumores generados por los distintos grupos (\*, indica  $p=0,010$  y \*\*, indica  $p=0,004$ ). **B)** Fotografías de las xenografías producidas en ratones atímicos inyectados con los transfectantes estables para la interferencia de Cdc42, i1, (panel superior) y la línea celular control, SW620 (panel inferior) (25 días).

Grupo	Nº lomos inoculados	Nº Lomos positivos	Incidencia (%)
Cdc42-i1	16	4	25
Cdc42-i3	16	16	100
SW620	16	15	94
Cdc42-wt1	16	13	81

**Tabla 8. Incidencia de generación de tumores en los distintos clones de interferencia de Cdc42, en la línea SW620 y en el clon de sobreexpresión wt1**

Los clones i3, wt1 y la línea parental SW620 generaron tumores con una incidencia muy similar, siendo del 100%, 94% y 81% respectivamente, dichas variaciones no son significativas y se consideran habituales en este tipo de técnicas. Para el caso del clon i1, dicha incidencia resultó drásticamente menor (25%) (Tabla 8). Para investigar la diferencia existente en la tasa de crecimiento y generación de tumores entre los clones interferentes i1 e i3, se extrajeron los tumores generados por estas líneas celulares estables y se realizaron ensayos de inmunodetección de Cdc42 en 3 tumores representativos de cada grupo (i1, i3) y de la línea control SW620 para comprobar si la interferencia de Cdc42 se había mantenido en los tumores obtenidos. Como se muestra en la Figura 23, en todos los casos analizados, la expresión de Cdc42 se había recuperado hasta unos niveles similares a los presentados por los tumores generados por la línea SW620 e incluso de la propia línea celular SW620. Estos resultados demuestran que para la generación y progresión tumoral de la línea SW620 es necesaria la sobreexpresión de Cdc42.



**Figura 23. Detección de los niveles de Cdc42 en los tumores generados en ratones atímicos.** Los extractos de proteína total fueron extraídos de los tumores generados por las células establemente transfectadas para interferencia de Cdc42 (i1 e i3) y por las células SW620. Estos extractos proteicos se resolvieron en una PAGE-SDS al 15% y fueron transferidos a membranas de PVDF. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo específico contra la proteína Cdc42. Los niveles de expresión de Cdc42 se normalizaron con GAPDH. Se muestran tres tumores representativos de cada grupo. Como control se determinó la expresión de Cdc42 en los clones de interferencia de Cdc42 y en la línea SW620 antes de inocularse en ratones. shARN: horquilla de ARN de interferencia.

### 5.11 Estudio de la expresión de los genes CACNA2D2, KIAA1456, TWIST1, p16INK4a e ID4 en un panel de líneas derivadas de cáncer colorrectal humano

Ha sido descrito previamente que los genes CACNA2D2, KIAA1456, p16INK4a, TWIST1 e ID4 se encuentran silenciados en uno o varios tipos de cáncer (Tabla 6) (Macaluso *et al.*, 2005). Estos genes se encuentran reprimidos por Cdc42 en la línea SW620. Con el objetivo de estudiar si estos genes, tenían un papel general de genes oncosupresores en cáncer colorrectal y si este efecto se correlaciona con los niveles de Cdc42, se realizó un estudio transcripcional en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos previamente analizadas para los niveles de expresión de Cdc42 (Figura 8). Para ello se compararon, por PCR cuantitativa, los niveles de ARNm de dichos genes en las

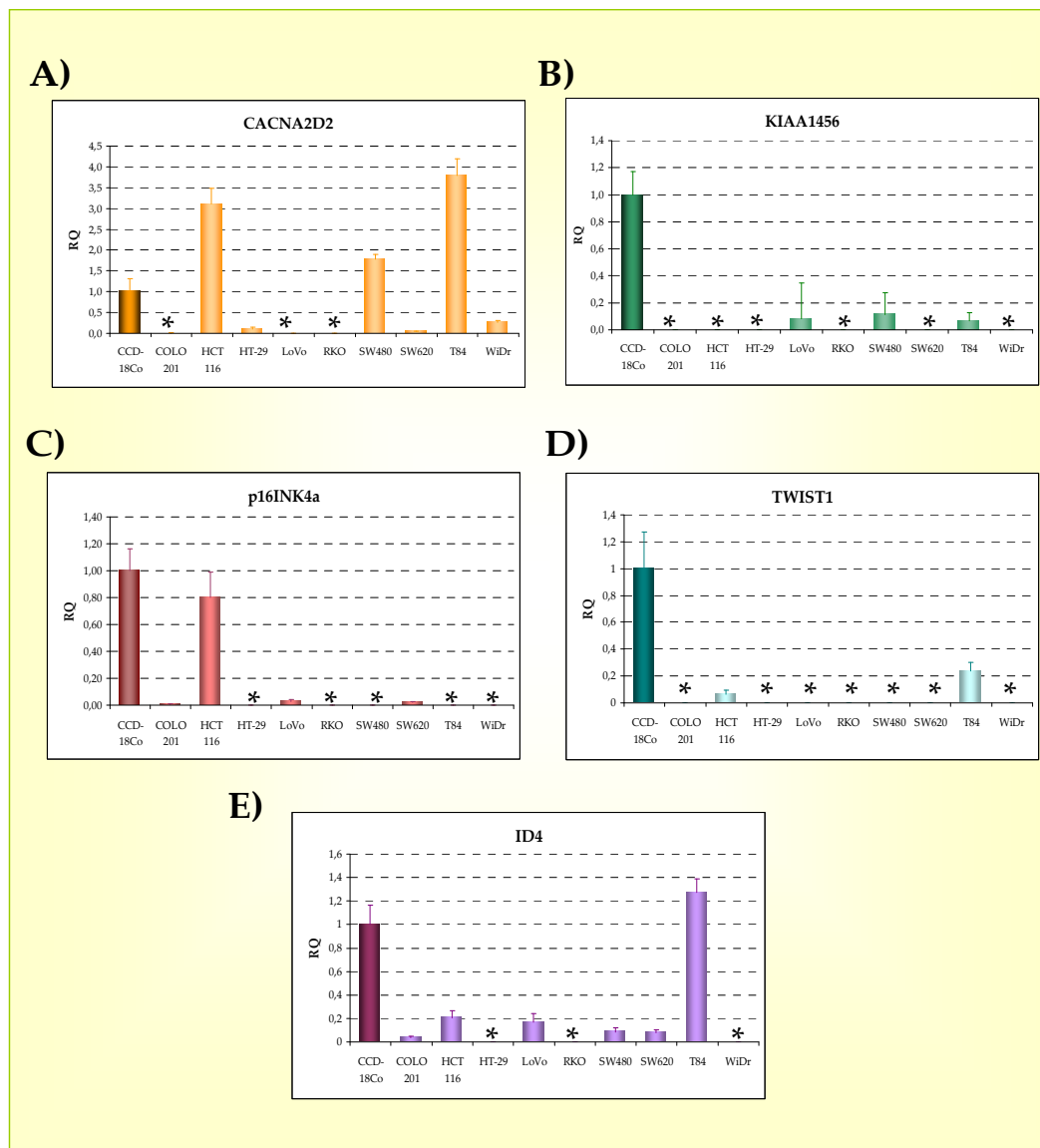
líneas tumorales, con respecto a los niveles de ARNm de la línea normal de colon, CCD-18Co. Conjuntamente y si fuese pertinente se investigaría el estado de metilación de los promotores de estos genes.

#### *5.11.1 CACNA2D2 se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos analizadas*

El ARN total extraído de las líneas celulares de cáncer colorrectal: COLO 201, HCT116, HT-29, LoVo, RKO, SW480, SW620, T84 y WiDr, y de la línea normal de colon, CCD-18Co, se retro-transcribió para realizar ensayos de amplificación por PCR a tiempo real tal y como se explica en Materiales y Métodos. Tras el análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero del gen CACNA2D2, se observó que presenta menor expresión en 6 de las 9 líneas celulares de estudio, COLO 201, HT-29, LoVo, RKO, SW620 y WiDr, es decir un 66,9%, comparada con la línea normal de colon (Figura 24A). De estas 6 líneas, 3 de ellas, LoVo, RKO y SW620 presentaban sobreexpresión de Cdc42. Para el caso de las líneas SW480, T84 y HCT116, los niveles de mensajero de CACNA2D2 son superiores a la línea primaria CCD-18Co. De ellas, la línea T84 tenía los niveles de Cdc42 disminuidos con respecto a la línea normal. Por tanto, estos resultados sugieren que CACNA2D2 podía ser un nuevo gen oncosupresor en cáncer colorrectal y que dicho silenciamiento podría estar asociado con la expresión de Cdc42.

#### *5.11.2 KIAA1456 se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos analizadas*

Los niveles transcripcionales del gen KIAA1456 estaban notablemente reducidos o eran inexistentes en las nueve líneas celulares comparados con los niveles presentados por la línea normal de colon, destacando las líneas COLO 201, HCT116, HT-29, RKO, SW620 y WiDr, en las cuales no se detectaron niveles de ARNm (Figura 24B). En conclusión, el gen KIAA1456 es un posible gen oncosupresor en cáncer colorrectal debido a que se encuentra silenciado en el 100% de las líneas de cáncer colorrectal analizadas con respecto al tejido normal de colon. Estos resultados confirman los obtenidos previamente para algunas de las líneas incluidas en este estudio (Flanagan *et al.*, 2004). Sería necesario un estudio más detallado para desvelar si dicho silenciamiento se asocia con Cdc42.



**Figura 24. Estudio de los niveles de expresión del ARNm de los genes CACNA2D2, KIAA1456 p16INK4a, TWIST1 e ID4, en un panel de 9 líneas derivadas de cáncer colorrectal y en la línea normal de colon CCD-18Co.** El ARN total extraído de las líneas derivadas de tumores colorrectales humanos: COLO 201, HCT116, HT-29, LoVo, RKO, SW480, SW620, T84 y WiDr, y el ARN total de la línea normal de colon humano CCD-18Co, se retro-transcribió para realizar ensayos de amplificación por PCR a tiempo real utilizando las sondas Taqman específicas para **A) CACNA2D2**, **B) KIAA1456**, **C) p16INK4a**, **D) TWIST1** y **E) ID4**. El gen utilizado como control interno fue  $\beta$ -2 microglobulina, para el caso de ID4 y ARN ribosomal 18S, para el resto de casos. Los datos se representan como "RQ" donde los valores de expresión superiores a la línea CCD-18Co (cuyo valor de referencia es 1) son mayores de 1 y los valores de expresión menor son inferiores a 1. La desviación estándar se representa como  $RQ_{max}-RQ$ .



### *5.11.3 P16INK4a se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos analizadas debido a la hipermetilación de su promotor*

El análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARNm del gen p16INK4a en el panel de líneas de CCR con respecto a la línea primaria de colon CCD-18Co, revelaba que los niveles transcripcionales de p16INK4a se encuentran silenciados en todas las líneas celulares analizadas, con una expresión prácticamente inapreciable en 8 de ellas. Sólo la línea HCT116, presentaba niveles de expresión del ARNm de p16INK4a, pero por debajo de los niveles de la línea celular normal (Figura 24C). Por tanto, en las 4 líneas de CCR con sobreexpresión de Cdc42, la transcripción del gen p16INK4a se encontraba silenciada. Sin embargo, este gen presentaba niveles reducidos en todas las líneas, independientemente del grado de expresión de Cdc42, sugiriendo que se podría estar inactivando por mecanismos alternativos distintos de Cdc42.

El análisis de su región promotora demostraba, como ya se ha descrito previamente para algunas de las líneas celulares de este estudio (Lind *et al.*, 2004), una correlación perfecta entre la expresión del ARNm y la hipermetilación (Figura 25A). Para el caso de HCT116, el promotor de p16INK4a se encontraba parcialmente metilado, traduciéndose en niveles de expresión transcripcional. En el resto de líneas celulares, que no expresaban p16INK4a, el promotor se encontraba totalmente metilado. Por tanto, estas evidencias demuestran que p16INK4a se encuentra silenciado en el 100% de las líneas de CCR analizadas, reforzando su papel ya descrito como gen oncosupresor en CCR. Además, este silenciamiento se produce por un mecanismo de hipermetilación de su promotor. En cuanto a la asociación de su silenciamiento epigenético con la expresión de Cdc42, los resultados mostrados avalan el interés de realizar un estudio más profundo para dilucidar el mecanismo implicado.

### *5.11.4 TWIST1 se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos debido a la hipermetilación de su promotor*

Se observó una pérdida generalizada de la expresión del gen TWIST1 cuando se comparaba con la línea normal de colon CCD-18Co (Figura 24D). Las líneas celulares COLO 201, HT-29, LoVo, RKO, SW620, SW480 y WiDr no presentaban expresión transcripcional de este gen, suponiendo el 77,8% de las líneas celulares analizadas. Las

líneas HCT116 y T84 presentaban niveles de TWIST1, pero menores a los de la línea normal de colon. En cuanto a la asociación de Cdc42, coincide que la línea de menores niveles de Cdc42, T84, es de las únicas que presenta expresión para este gen. Debido a que se produce un silenciamiento mayoritario no fue posible ver la posible asociación con Cdc42, sería necesario disponer de más líneas celulares o de muestras tumorales de pacientes para dicho estudio de correlación.

El análisis por MSP del promotor del gen TWIST1 en estas líneas celulares reveló que para todos los casos el silenciamiento transcripcional era debido a la hipermetilación de la región promotora analizada (Figura 25B). Se observó que esta hipermetilación se producía tanto en los casos donde no había expresión transcripcional alguna: COLO-201, HT-29, LoVo, RKO, SW480 y SW620, como en los casos donde la expresión se encontraba muy reducida, HCT116 y T84. Esto sugiere que la metilación de la región promotora analizada, rica en dinucleótidos CpG, es clave para que se produzca el silenciamiento transcripcional de TWIST1. Sin embargo, para poder explicar las diferencias entre la inactivación total o parcial de la expresión sería necesario un análisis por BSP de esta región para ver si existen diferencias en alguno de los dinucleótidos CpG contenidos en esta zona.

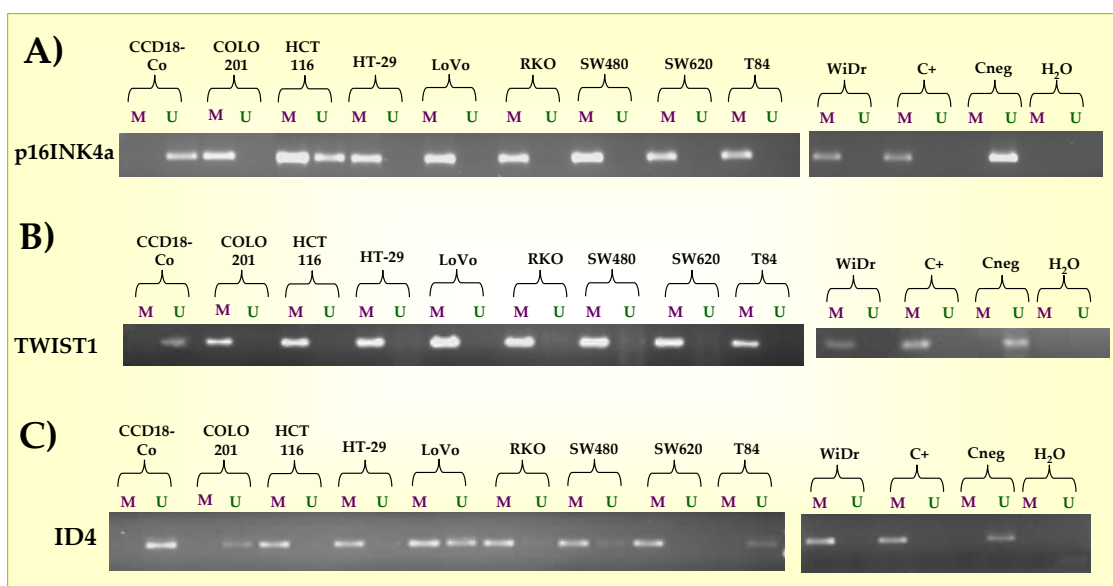
Los resultados presentados en este apartado demuestran que el gen TWIST1 se encuentra silenciado en todas las líneas tumorales de CCR analizadas, sugiriendo un papel de TWIST1 como gen supresor tumoral en este tipo de cáncer. Asimismo, la hipermetilación del promotor de este gen parece ser el mecanismo de silenciamiento transcripcional en dichas líneas celulares derivadas de tumores colorrectales.

#### *5.11.5 ID4 se encuentra silenciado en el panel de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos analizadas debido, principalmente, a la hipermetilación de su promotor*

Los resultados obtenidos, normalizados con respecto a  $\beta$ -2 microglobulina, revelan que ID4 presenta niveles menores que la línea primaria de colon en todas las líneas celulares excepto en T84, la cual presentaba unos niveles de expresión de ID4 discretamente superiores a la línea normal (Figura 24E). Esta última línea celular presentaba los niveles de proteína Cdc42 más bajos, con lo que concordaría con la expresión de ID4. Las líneas HT-29, RKO y WiDr, habían perdido por completo la expresión de ID4, mientras que las líneas COLO 201, HCT116, LoVo, SW480 y SW620

presentaban unos niveles de expresión muy bajos. Las cuatro líneas celulares de CCR, cuyos niveles de proteína Cdc42 eran superiores a la línea primaria, LoVo, RKO, SW480 y SW620, presentaban un silenciamiento transcripcional de ID4 con respecto a CCD-18Co. Estos resultados demuestran que el gen ID4 se encuentra reprimido en la mayoría de las líneas derivadas de CCR analizadas (88,8%), lo que sugiere que ID4 podría estar actuando como un gen oncosupresor en CCR. Además este silenciamiento podría estar asociado con la sobreexpresión de Cdc42 en las líneas derivadas de cáncer colorrectal examinadas.

Para investigar si el silenciamiento de ID4 se produce por un mecanismo epigenético, al igual que lo observado en SW620, se estudió el estado de metilación del promotor proximal de ID4 por la técnica de MSP en las distintas líneas celulares (Figura 25C). Se observó que, en las líneas HCT116, HT-29, RKO, SW620 y WiDr, los niveles de ARNm muy disminuidos o inexistentes se correlacionaban con la metilación del promotor. Asimismo, la línea T84 con niveles de expresión transcripcional prácticamente iguales a la línea normal, presentaba la región promotora de ID4, totalmente desmetilada, al igual que la línea de referencia, CCD-18Co. Sin embargo, no se observó tal correlación para las líneas COLO 201, LoVo y SW480, con muy baja expresión de ID4, pero el promotor se encontraba totalmente desmetilado en el caso de COLO 201, o parcialmente desmetilado, en LoVo y SW480. Por tanto sólo el 50% de las líneas con sobreexpresión de Cdc42, SW620 y RKO, presentaban una asociación entre expresión y estado del promotor del gen ID4. Estos resultados demuestran que existe una correlación entre el silenciamiento de ID4 y la metilación de su promotor en la mayoría de las líneas celulares de CCR analizadas (71,4%). Sin embargo sería necesario un panel más amplio de líneas para determinar si el silenciamiento epigenético de ID4 esta relacionado con Cdc42.



**Figura 25. Estudio del estado de metilación de los promotores de los genes *ID4* y *p16INK4a* en un panel de 9 líneas derivadas de cáncer colorrectal y en la línea normal de colon CCD-18Co.** El ADN extraído de las 9 líneas derivadas de tumores colorrectales humanos: COLO 201, HCT116, HT-29, LoVo, RKO, SW480, SW620, T84 y WiDr, y de la línea normal de colon CCD-18Co, fue modificado con bisulfito sódico y amplificado por PCR específica de metilación (MSP) usando un par de cebadores diseñados para distinguir específicamente la forma metilada (M) de la no metilada (U) de las regiones promotoras de los genes **A)** *p16INK4a* **B)** *TWIST1* y **C)** *ID4*. Se usaron tres controles, un ADN genómico comercial de varón metilado en su totalidad de forma artificial (*CpGenome™ Universal Methylated DNA*) como control de metilación (C+); ADN de sangre periférica de donantes sanos como control de no metilación (Cneg) y H<sub>2</sub>O como control de no contaminación de las PCRs.

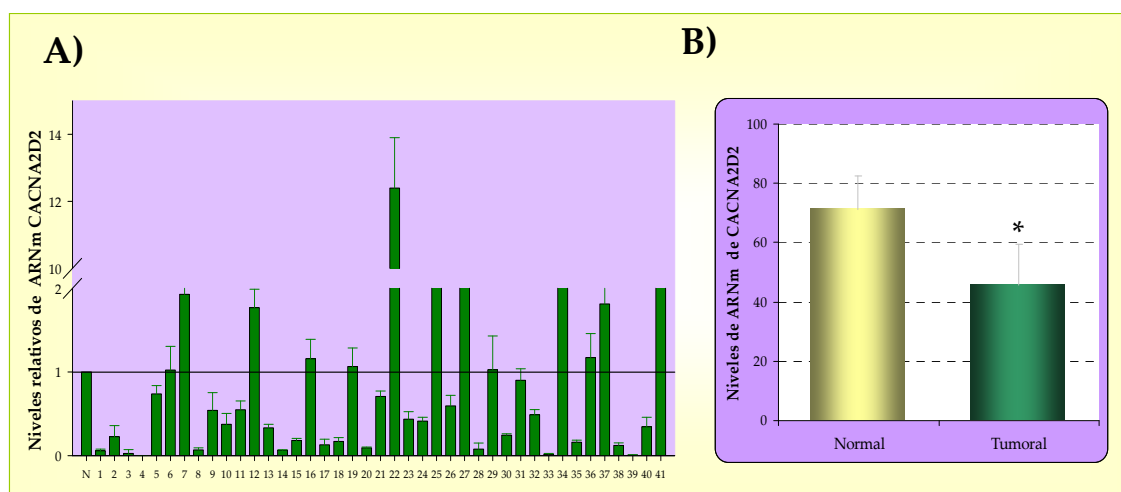
## 5.12 Estudio de la expresión de los genes *CACNA2D2*, *KIAA1456*, *p16INK4a*, *TWIST1* e *ID4* en tumores colorrectales humanos y de su posible asociación con *Cdc42*

Una vez demostrado que *Cdc42* se encuentra sobreexpresado en tumores colorrectales humanos, que juega un papel clave en la progresión tumoral *in vivo*, y que su efecto oncogénico puede venir dado por el silenciamiento de los posibles genes supresores en cáncer colorrectal *CACNA2D2*, *KIAA1456*, *p16INK4a*, *TWIST1*, e *ID4*, se quisieron consolidar dichas evidencias en muestras de tumores colorrectales humanos. Partiendo de los mismos casos que fueron analizados para los niveles de *Cdc42*, de los que se disponía tanto de tejido tumoral, como de tejido normal adyacente de cada paciente, se extrajo el ARN total y se analizó la expresión de estos 5 genes por PCR cuantitativa. Para cada amplificación por PCR, se seleccionaron los casos donde los triplicados y las desviaciones estándar, tanto del tejido normal como tumoral, reunían una suficiente calidad,

disponiendo, finalmente, de 41 casos para la expresión de CACNA2D2 y KIAA1456; 40 casos para p16INK4a, 54 casos para TWIST1 y 55 casos para ID4.

### 5.12.1 CACNA2D2 se encuentra silenciado en las muestras tumorales analizadas de pacientes con cáncer colorrectal y sus niveles se asocian con diversos parámetros clínico-patológicos

El análisis por PCR a tiempo real de la expresión del gen CACNA2D2 en las muestras de pacientes con cáncer colorrectal revelaba que, en 28 de los 41 casos analizados (68,3%), los niveles de expresión en las muestras tumorales eran menores que en su correspondiente tejido normal adyacente (Figura 26A). Además, la comparación de los niveles de expresión en los tejidos tumorales con los niveles presentados por los tejidos normales reflejaba un silenciamiento estadísticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) (Figura 26B). Estos resultados suponen la primera evidencia del silenciamiento del gen CACNA2D2 en cáncer colorrectal.



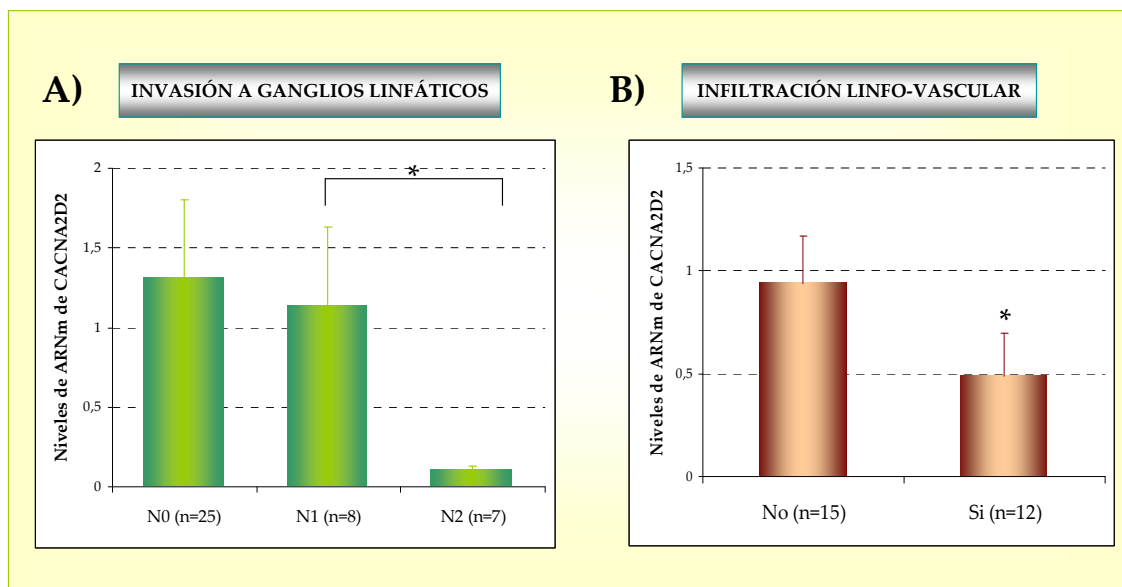
**Figura 26. Los niveles de ARNm del gen CACNA2D2 se encuentran disminuidos en las muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal.** El ARN total extraído de muestras de tejido tumoral y normal de 41 pacientes, se analizó por PCR a tiempo real utilizando una sonda Taqman específica para CACNA2D2. **A)** Niveles de expresión de CACNA2D2 normalizados con el ARN ribosomal 18S en cada tejido tumoral y relativos a la expresión en su correspondiente tejido normal, según el método de "RQ". La expresión del tejido normal fue relativizada a 1 en cada caso y se muestra en la primera columna como "N" y la línea horizontal. La desviación estándar se representa como  $RQ_{max}-RQ$ . **B)** Niveles de ARNm de CACNA2D2 normalizados con ARN ribosomal 18S en todas las muestras normales comparadas con las tumorales, según el método de "AQ" (\* indica  $p < 0,0001$ ). Los datos representados corresponden a la media  $\times 10^8 \pm SEM$ .

Con el objetivo de comprobar si la pérdida de expresión del gen podría ser relevante en la progresión de este tipo de cáncer, se realizó un análisis estadístico de la asociación entre los niveles transcripcionales del gen CACNA2D2 y las características clínico-patológicas de los tumores analizados (Tabla 9). Como resultado de este estudio, se

encontró que la disminución de los niveles de ARNm de CACNA2D2 se relacionaba con la invasión a ganglios linfáticos (N), en el paso de N1 a N2, es decir con el incremento en el número de ganglios afectados ( $p=0,011$ ) (Figura 27A). Asimismo, se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el silenciamiento transcripcional de CACNA2D2 y la infiltración linfo-vascular de células neoplásicas en la región del tumor primario ( $p=0,040$ ) (Figura 27B). Ambos resultados sugieren que CACNA2D2 podría tener un papel clave en los primeros pasos del proceso de invasión a otros órganos, y por tanto la pérdida de expresión de este gen podría estar implicado en el desarrollo de un fenotipo más agresivo.

	Total	Niveles de CACNA2D2 (punto de corte 1)		valor <i>p</i>
	n=41	Bajos (n=28 )	Altos (n= 13)	
Edad (años) media ± SEM	71,37 ± 1,54	71,71 ± 1,89	70,62 ± 2,73	0,744*
	Total	Niveles de CACNA2D2 (Media ± SEM)		valor <i>p</i>
Sexo, n(%)				
Hombres	26 ( 66,4)	0,95 ± 0,21		0,449**
Mujeres	15 (36,6)	1,26 ± 0,80		
Tumor primario (T), n(%)				
T2	5 (12,2)	0,68 ± 0,29		0,180***
T3	32 (78)	1,22 ± 0,40		
T4	4 (9,8)	0,25 ± 0,22		
Nodulos linfáticos (N), n(%)				
N0	25 (61)	1,31 ± 0,49		0,012***
N1	8 (19,5)	1,13 ± 0,50		
N2	7 (17,1)	0,10 ± 0,03		
NX	1(2,4)			
Grado histopatológico, n(%)				
G1	2 (4,9)	0,59 ± 0,43		0,085**
G2	34 (82,9)	1,21 ± 0,38		
G3	5 (12,2)	0,20 ± 0,06		
Tipo de cáncer colorrectal				
Cáncer de colon	29 (70,7)	1,27 ± 0,44		0,229**
Cáncer de recto	12 (29,3)	0,56 ± 0,19		
Invasión linfo-vascular				
No	15 (36,6)	0,94 ± 0,23		0,040**
Sí	12 (29,3)	0,49 ± 0,21		
Sin información	14 (34,1)			
* T de Student				
** Test de Mann Whitney				
*** Test de Kruskal-Wallis				

**Tabla 9. Datos clínico-patológicos de los 41 pacientes con cáncer colorrectal analizados para los niveles de expresión de CACNA2D2.** Se muestra la comparación de medias entre los valores de CACNA2D2 y los parámetros clínico-patológicos (media de los valores RQ  $\pm$  SEM). Sólo para el dato de la edad se estableció un punto de corte en la expresión de CACNA2D2, correspondiente a 1, para distribuir a los pacientes de las distintas edades. Se muestra el valor *p* del test estadístico aplicado en cada caso.



**Figura 27. Los niveles disminuidos de CACNA2D2 se asocian con el aumento del número de ganglios linfáticos afectados por células tumorales y con la infiltración linfo-vascular. A)** Comparación de medias de los niveles relativos de CACNA2D2 en las muestras tumorales en función de la invasión a ganglios linfáticos. Existe una correlación significativa con el aumento del número de ganglios afectados (paso de N1 a N2) (\*,  $p=0,011$ ). **B)** Comparación de medias del gen CACNA2D2 en las muestras tumorales en función de la infiltración linfo-vascular (\*,  $p=0,040$ ).

Los resultados anteriores coinciden con los obtenidos para Cdc42, ya que la sobreexpresión significativa de esta GTPasa Rho se asocia igualmente con la invasión a un mayor número de ganglios linfáticos. Debido a que en el modelo celular *in vitro*, se encontró que Cdc42 regulaba transcripcionalmente al gen CACNA2D2, se estudió si existía tal correlación en las muestras de pacientes (Tabla 10). Como resultado de este análisis se encontró que de los 26 casos de sobreexpresión de Cdc42, 19 presentaban niveles reducidos de CACNA2D2 (73,1%). Sin embargo, 9 de los 15 casos sin sobreexpresión de Cdc42 (60%) presentaban también una reducción de la expresión del gen CACNA2D2. Por ello, esta relación no alcanzaba la significancia estadística ( $p=0,492$ ). Seleccionando los 7 casos clasificados como N2, donde tanto la sobreexpresión de Cdc42 como el silenciamiento de CACNA2D2 parecen ser factores determinantes, se observó que en 5 de ellos, el silenciamiento de CACNA2D2 se asociaba con la sobreexpresión de Cdc42 (datos no mostrados). Por tanto, en esta serie de pacientes no se encontró una correlación estadística entre la sobreexpresión de Cdc42 y el silenciamiento de CACNA2D2. Sin embargo, un estudio más amplio enfocado a pacientes que presenten invasión en 4 o más ganglios linfáticos (N2), podría manifestar dicha relación.

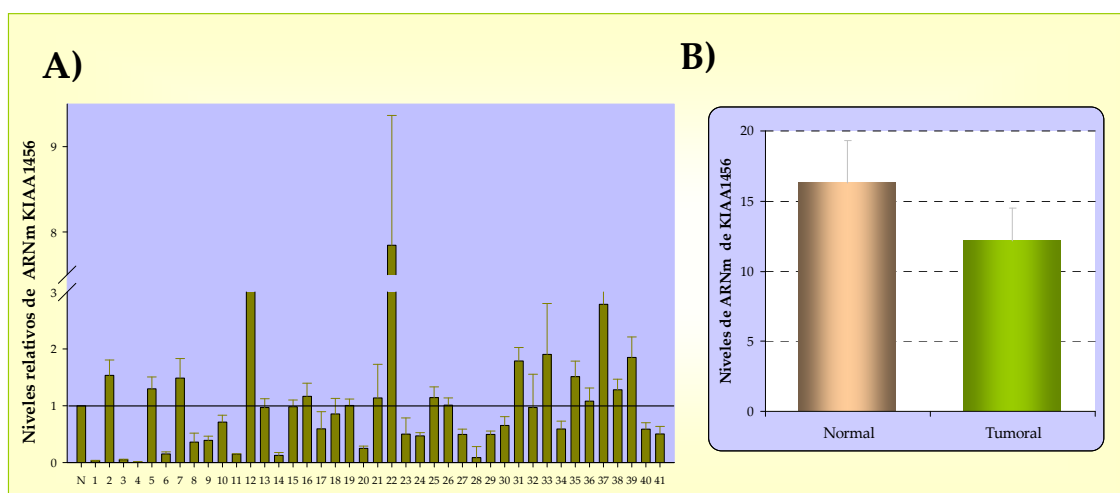
		Expresión de CACNA2D2		Total	valor <i>p</i>	
		Baja	Alta			
Expresión de Cdc42	Baja	Número de casos	9	6	15	0,492
		%Expresión de Cdc42	60%	40%	100,0%	
		% Expresión de CACNA2D2	32,1%	46,2%	36,6%	
	Alta	Número de casos	19	7	26	
		%Expresión de Cdc42	73,1%	26,9%	100,0%	
		% Expresión de CACNA2D2	67,9%	53,8%	63,4%	
Total	Número de casos	28	13	41		
	%Expresión de Cdc42	68,3%	31,7%	100,0%		
	% Expresión de CACNA2D2	100,0%	100,0%	100,0%		

**Tabla 10. Asociación entre la expresión de Cdc42 y CACNA2D2 en las muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal.** Se presenta la tabla de contingencia para los valores discretos de expresión de la proteína Cdc42 (donde el punto de corte se estableció en 1,5) y los valores discretos de ARNm de CACNA2D2 (donde el punto de corte se estableció en 1).

### 5.12.2 KIAA1456 se encuentra silenciado en las muestras tumorales analizadas de pacientes con cáncer colorrectal y su expresión se asocia con Cdc42 y con el grado de diferenciación histopatológico

El análisis de los niveles de expresión transcripcional del gen KIAA1456 se llevó a cabo en muestras de 41 pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal. Como resultado de este estudio, se encontró que en 17 casos de los 41 analizados (41,5%), los niveles del ARNm de KIAA1456 se encontraban disminuidos en las muestras tumorales con respecto a su correspondiente tejido normal adyacente (Figura 28A). Sin embargo, al realizar el estudio estadístico comparando los niveles de expresión de KIAA1456 en los tejidos normales con respecto a los tumorales, se observó una tendencia estadística ( $p=0,1$ ) de silenciamiento de este gen (Figura 28B), debido a que existe variabilidad de expresión intrínseca entre las muestras normales. Por ello, es preferible, para el estudio de la relación de la expresión del gen con las características clínico-patológicas, utilizar el valor “RQ”, que refleja el grado de sobreexpresión o silenciamiento en una muestra tumoral con respecto al correspondiente tejido normal adyacente del mismo paciente.





**Figura 28. Los niveles de ARNm del gen KIAA1456 se encuentran disminuidos en las muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal.** El ARN total extraído de muestras de tejido tumoral y normal adyacente al tumor de 41 pacientes, se retro-transcribió para realizar ensayos de amplificación por PCR a tiempo real utilizando una sonda Taqman específica para KIAA1456. **A)** Niveles de expresión del gen KIAA1456 normalizados con el ARN ribosomal 18S en cada tejido tumoral relativos a su correspondiente tejido normal, según el método de "RQ". La desviación estándar se representa como  $RQ_{max}-RQ$ . El valor de cada tejido normal fue relativizado a 1 y se representa como "N" y la línea horizontal. **B)** Niveles de ARNm de KIAA1456 normalizados con el ARN ribosomal 18S en todas las muestras normales comparadas con las tumorales, según el método de "AQ". Los datos representados corresponden a la media  $\times 10^8 \pm SEM$ .

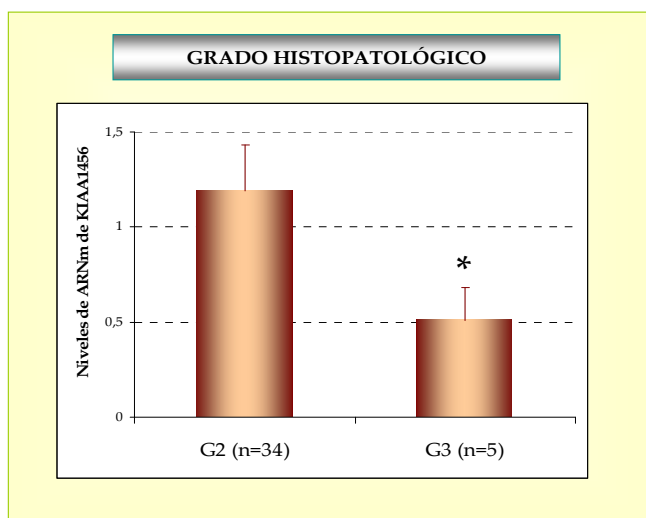
Tras el análisis estadístico de la correlación entre el grado de expresión del gen KIAA1456 y las características clínico-patológicas (Tabla 11), se descubrió que niveles reducidos de la expresión de este gen se asociaban con los tumores pobremente diferenciados ( $G3$ ,  $p=0,046$ ) (Figura 29).

Esta asociación coincide con la hallada para la sobreexpresión de Cdc42. Al estudiar si la correlación entre Cdc42 y KIAA1456, observada en la línea SW620, existía en las muestras clínicas, se encontró que en 18 de los 26 casos de sobreexpresión de Cdc42 en las muestras tumorales (69,2%), el gen KIAA1456 estaba silenciado. Por otro lado, 9 de los 15 casos con niveles reducidos de Cdc42, presentaban una mayor expresión de KIAA1456 (60%) (datos no mostrados), correlación que se encontró estadísticamente significativa con un valor  $p$  de 0,011 (Figura 30).

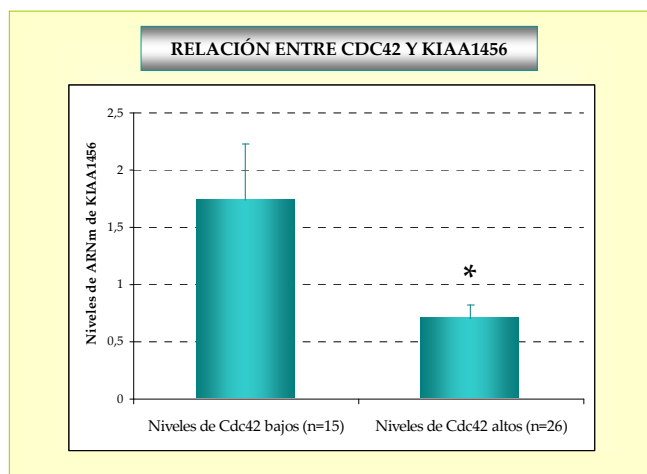
Como conclusión de este apartado, se confirmó que, KIAA1456 es un gen silenciado en CCR, reforzando su posible papel de gen oncosupresor en este tipo tumoral. La pérdida de expresión de KIAA1456 está asociada con el grado de diferenciación histopatológico del tumor. Adicionalmente, se ratificó la relación entre Cdc42 y KIAA1456 observada en la línea celular, encontrando el mismo tipo de correlación en la clínica, lo cual refuerza significativamente los datos encontrados *in vitro*.

	Total	Niveles de KIAA1456 (punto de corte 1)		valor <i>p</i>
	n=41	Bajos (n=24 )	Altos (n= 17)	
Edad (años) media ± SEM	71,37 ± 1,54	70,08 ± 2,17	73,18 ± 2,09	0,432*
	Total	Niveles de KIAA1456 (Media ± SEM)		valor <i>p</i>
Sexo, n(%)				
Hombres	26 ( 66,4)	1,05 ± 0,16		0,310**
Mujeres	15 (36,6)	1,16 ± 0,50		
Tumor primario (T), n(%)				
T2	5 (12,2)	1,23 ± 0,69		0,306***
T3	32 (78)	1,02 ± 0,24		
T4	4 (9,8)	1,45 ± 0,40		
Nodulos linfáticos (N), n(%)				
N0	25 (61)	1,29 ± 0,32		0,228***
N1	8 (19,5)	1,01 ± 0,15		
N2	7 (17,1)	0,58 ± 0,25		
NX	1(2,4)			
Grado histopatológico, n(%)				
G1	2 (4,9)	0,83 ± 0,68		0,046****
G2	34 (82,9)	1,19 ± 0,24		
G3	5 (12,2)	0,51 ± 0,17		
Tipo de cáncer colorrectal				
Cáncer de colon	29 (70,7)	1,28 ± 0,28		0,075**
Cáncer de recto	12 (29,3)	0,63 ± 0,19		
Invasión linfo-vascular				
No	15 (36,6)	0,80 ± 0,10		0,542**
Sí	12 (29,3)	0,69 ± 0,17		
Sin información	14 (34,1)			
* T de Student				
** Test de Mann Whitney				
*** Test de Kruskal-Wallis				
**** Test de Chi Cuadrado				

**Tabla 11. Datos clínico-patológicos de los 41 pacientes con cáncer colorrectal analizados para los niveles de expresión transcripcional de KIAA1456.** Se muestra la comparación de medias entre los parámetros clínico-patológicos y los valores relativos de KIAA1456 en las muestras tumorales (media de RQ  $\pm$  SEM). Sólo para el dato de la edad se estableció un punto de corte de "1" de expresión de KIAA1456 para distribuir a los pacientes de las distintas edades. Se muestra el valor *p* del test estadístico aplicado en cada caso.



**Figura 29. Los niveles disminuidos de KIAA1456 se asocian con tumores pobremente diferenciados.** Comparación de medias de los niveles relativos de KIAA1456 en las muestras tumorales en función del grado de diferenciación G2 y G3 (\*, *p*=0,046).

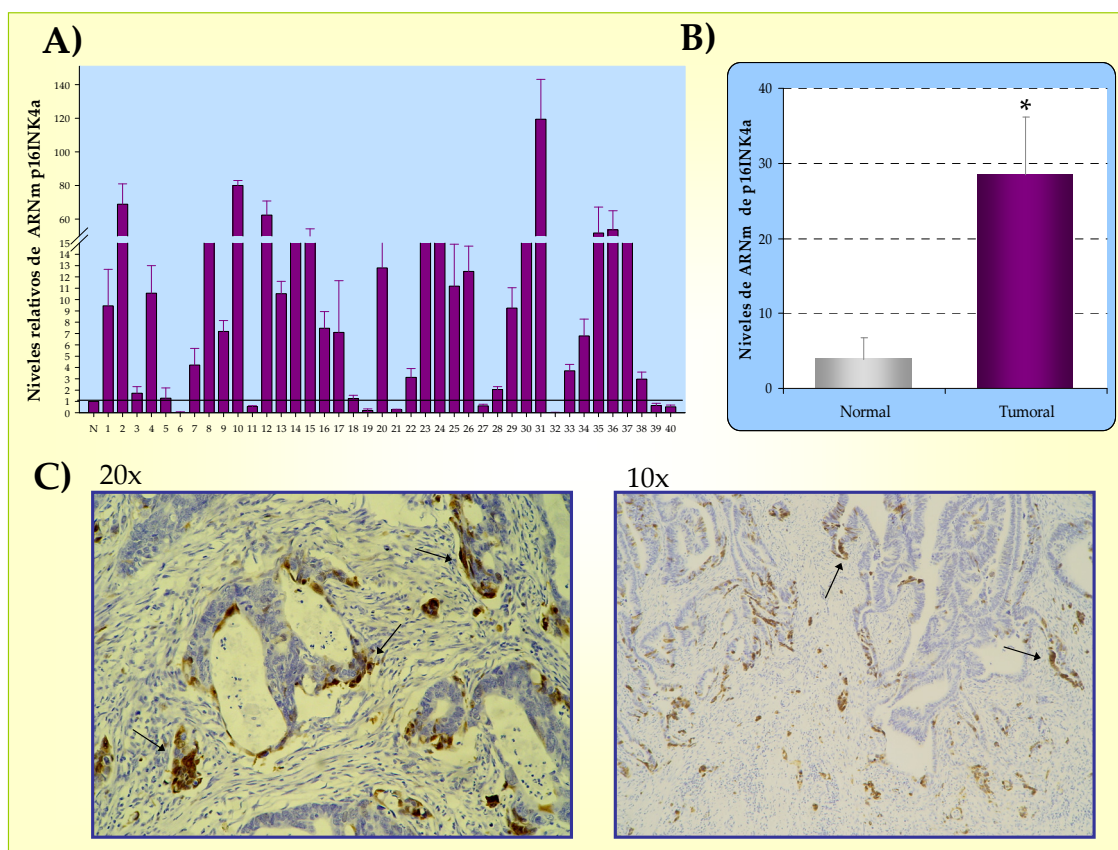


**Figura 30. Asociación entre los niveles de expresión de KIAA1456 y la sobreexpresión de Cdc42.** Comparación de medias de los niveles relativos de KIAA1456 en las muestras tumorales en relación con los niveles elevados o reducidos de Cdc42, estableciendo como punto de corte el valor de Cdc42 de 1,5 (\*,  $p=0,011$ ).

### 5.12.3 *P16INK4a se encuentra sobreexpresado en las muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal y su expresión se asocia con los bordes invasivos del tumor*

El análisis por PCR a tiempo real de 40 muestras de pacientes con CCR, desveló que p16INK4a se encuentra sobreexpresado en un 80% de los tejidos tumorales analizados (Figura 31A) de forma significativa ( $p<0,0001$ ) (Figura 31B). Estos resultados se encuentran en consonancia con datos previos publicados (Dai *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005; Ohhara *et al.*, 1996; Palmqvist *et al.*, 2000). Para profundizar en la causa de dicha sobreexpresión, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en diversas muestras representativas de tejido tumoral, donde los niveles de ARNm de p16INK4a se encontraban incrementados. Como resultado de este análisis, se observó que la proteína p16 se expresaba en zonas muy concretas de la masa tumoral que, por su localización y morfología, sugerían ser células tumorales del borde invasivo (Figura 31C), región donde las células requieren una parada en el ciclo celular para comenzar a migrar. Estos resultados coinciden con datos ya publicados por otros autores (Palmqvist *et al.*, 2000).

En el análisis estadístico de la relación de la expresión transcripcional de p16INK4a con los parámetros clínico-patológicos de los tumores colorrectales no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa (datos no mostrados). Como era de esperar, tampoco se encontró una correlación entre la sobreexpresión de Cdc42 y el silenciamiento de p16INK4a, donde de los 25 casos de sobreexpresión de Cdc42, sólo en 3 de ellos (12%) p16INK4a se encontraba disminuido, por otro lado, de los 15 casos de niveles reducidos de Cdc42, en 10 de ellos p16INK4a (66,7%) se encontraba aumentado (datos no mostrados).

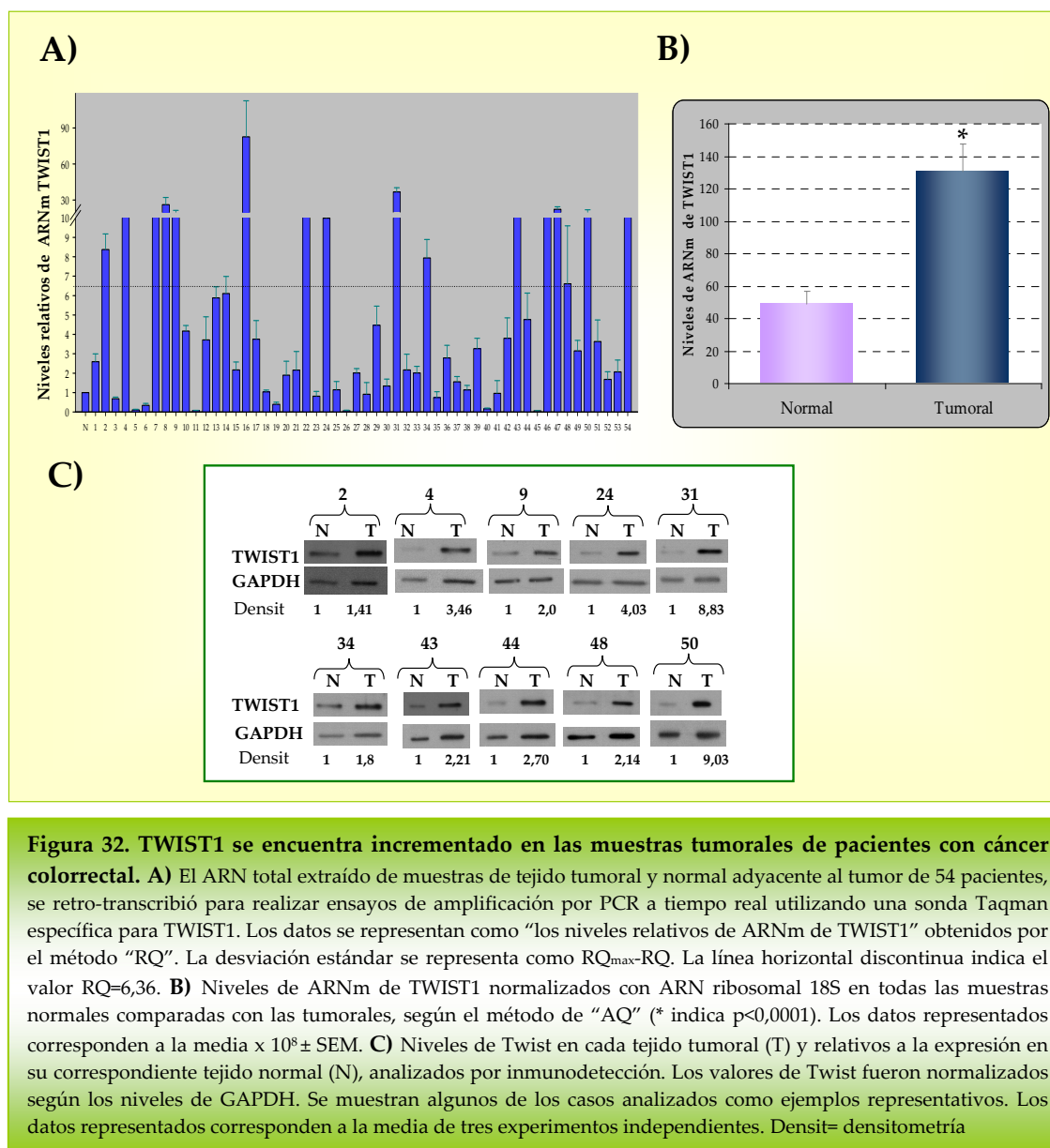


**Figura 31. Los niveles de ARNm del gen de p16INK4a se encuentran incrementados en las muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal.** El ARN total extraído de muestras de tejido tumoral y normal adyacente al tumor de 40 pacientes, se analizó por RT-PCR a tiempo real utilizando una sonda Taqman específica para p16INK4a. **A)** Niveles de expresión transcripcional de p16INK4a normalizados con el ARN ribosomal 18S en cada tejido tumoral y relativos a su correspondiente tejido normal, según el método de "RQ". El valor de los tejidos normales fue relativizado a "1" y se muestra en la primera columna ("N" y la línea horizontal). La desviación estándar se representa como  $RQ_{max}-RQ$ . **B)** Comparación de los niveles de ARNm de p16INK4a, normalizados con ARN ribosomal 18S, de las muestras normales con las tumorales, según el método de "AQ" (\* indica  $p < 0,0001$ ). Los datos representados corresponden a la media  $\times 10^8 \pm SEM$ . **C)** Análisis por inmunohistoquímica de los niveles de proteína p16 en muestras tumorales representativas con niveles de ARNm de p16INK4a incrementados. Las flechas indican ejemplos de células significativamente teñidas por el anticuerpo específico contra p16, las cuales se localizan en los bordes invasivos de la masa tumoral.

Por tanto, los niveles de ARNm del gen p16INK4a se encuentran significativamente incrementados en las muestras tumorales analizadas, esto puede deberse a que dicho incremento de la expresión se produce de forma específica en las células transformadas del borde invasivo del tumor. Estos resultados serán desarrollados con mayor detalle en el apartado de discusión. Por otro lado, no se ha encontrado la relación con Cdc42 en el ámbito heterogéneo de muestras de pacientes.

*5.12.4 TWIST1 se encuentra sobreexpresado en las muestras tumorales analizadas de pacientes con cáncer colorrectal y su expresión se asocia con el sexo de los pacientes y la invasión a ganglios linfáticos*

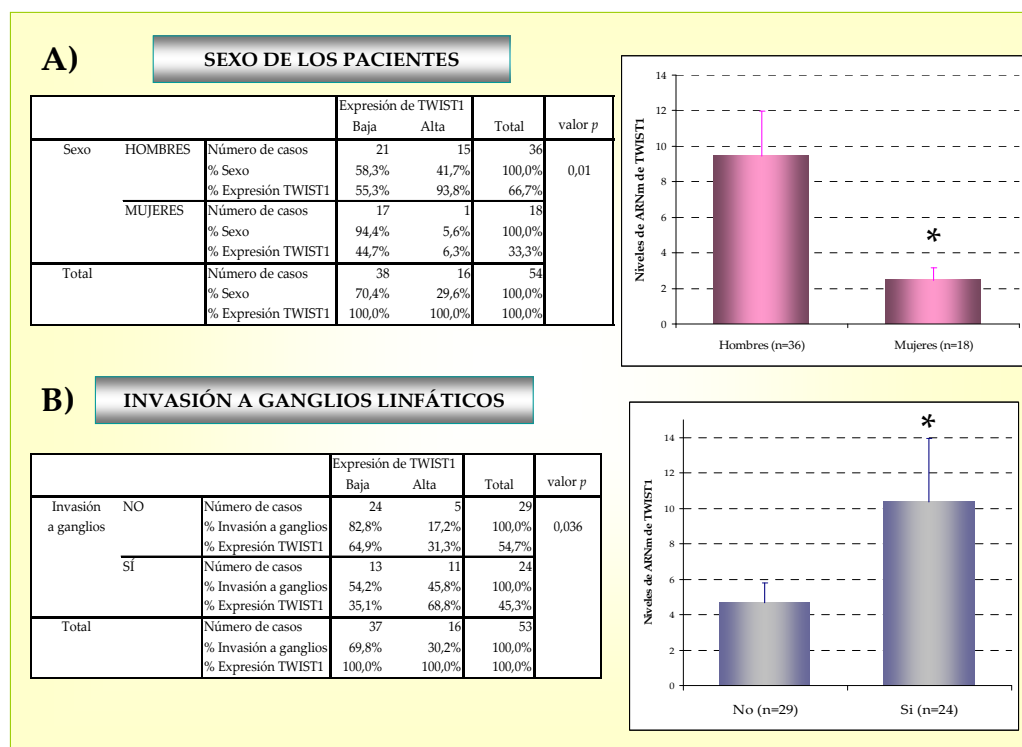
Con el objetivo de elucidar el papel de TWIST1 en CCR y si su expresión se correlacionaba con Cdc42, se analizaron los niveles de ARNm de TWIST1 en muestras de tejido tumoral y su correspondiente tejido normal adyacente, de 54 pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal. El resultado del estudio por PCR cuantitativa reveló que este gen se sobreexpresa en las muestras tumorales en un porcentaje del 77,8% de los casos con respecto al tejido normal del mismo paciente (Figura 32A). El patrón de expresión, obtenido por el método AQ, entre los tejidos normales y tumorales también se encontró estadísticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) (Figura 32B). Complementariamente a los niveles de expresión transcripcional, se realizaron ensayos de inmunodetección de la proteína Twist en una serie de casos representativos de marcada sobreexpresión de TWIST1. Como se muestra en la Figura 32C, todos estos casos seleccionados presentaban niveles incrementados de Twist en las muestras de tejido tumoral comparado con su correspondiente tejido normal, sugiriendo que TWIST1 podría desempeñar un papel crucial en la carcinogénesis colorrectal. Estos resultados están en consonancia con lo observado en un elevado número de tipos tumorales donde TWIST1 se encuentra sobreexpresado y parece ser clave en ciertas etapas del proceso de metástasis como la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Yang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006a).



**Figura 32. TWIST1 se encuentra incrementado en las muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal.** **A)** El ARN total extraído de muestras de tejido tumoral y normal adyacente al tumor de 54 pacientes, se retro-transcribió para realizar ensayos de amplificación por PCR a tiempo real utilizando una sonda Taqman específica para TWIST1. Los datos se representan como “los niveles relativos de ARNm de TWIST1” obtenidos por el método “RQ”. La desviación estándar se representa como  $RQ_{max}-RQ$ . La línea horizontal discontinua indica el valor  $RQ=6,36$ . **B)** Niveles de ARNm de TWIST1 normalizados con ARN ribosomal 18S en todas las muestras normales comparadas con las tumorales, según el método de “AQ” (\* indica  $p < 0,0001$ ). Los datos representados corresponden a la media  $\times 10^8 \pm SEM$ . **C)** Niveles de Twist en cada tejido tumoral (T) y relativos a la expresión en su correspondiente tejido normal (N), analizados por inmunodetección. Los valores de Twist fueron normalizados según los niveles de GAPDH. Se muestran algunos de los casos analizados como ejemplos representativos. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Densit= densitometría

Estos resultados suponen un nuevo hallazgo en este tipo tumoral, ya que, hasta la fecha, no existían evidencias de la regulación de este gen en cáncer colorrectal. Por tanto, para profundizar más en la implicación de TWIST1 en el desarrollo y progresión de este tipo tumoral se realizó un estudio estadístico profundo de la asociación entre los niveles incrementados de TWIST1 y los datos clínico-patológicos disponibles. Para ello, los pacientes fueron clasificados en subgrupos de relevancia clínica por la metodología ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Se estableció un punto de corte para la expresión relativa de TWIST1 de 6,36 (indicado en la Figura 37A por una línea horizontal discontinua) que presentaba una especificidad del 82,8% (Tabla 12). Con estas premisas, se observó una correlación estadísticamente significativa entre la elevada expresión de TWIST1 y los pacientes de sexo masculino ( $p=0,01$ , Figura 33A), lo que sugiere una posible regulación

transcripcional de TWIST1 mediada por hormonas sexuales. Adicionalmente se descubrió que los niveles incrementados de TWIST1 en las muestras tumorales se relacionan con la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos regionales ( $p=0,036$ , Figura 33B), que podría asociarse con su papel en la EMT, lo cual se relaciona con estadios más avanzados del cáncer colorrectal. En este sentido, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para vislumbrar la localización de esta proteína dentro de la masa tumoral. Como se muestra en la Figura 34, en las muestras de tejido normal no se observó expresión de la proteína Twist (Figura 34A). Sin embargo, en los tejidos tumorales se observó una fuerte tinción de algunas células estromales localizadas en el frente invasivo del tumor (Figura 34B y C). A pesar de que las células positivas para la tinción de Twist morfológicamente parecen ser estromales, es posible que sean derivadas de células tumorales y que hayan sufridos cambios morfológicos por estar sufriendo la EMT, ya que la células estromales del tejido normal no expresan Twist.



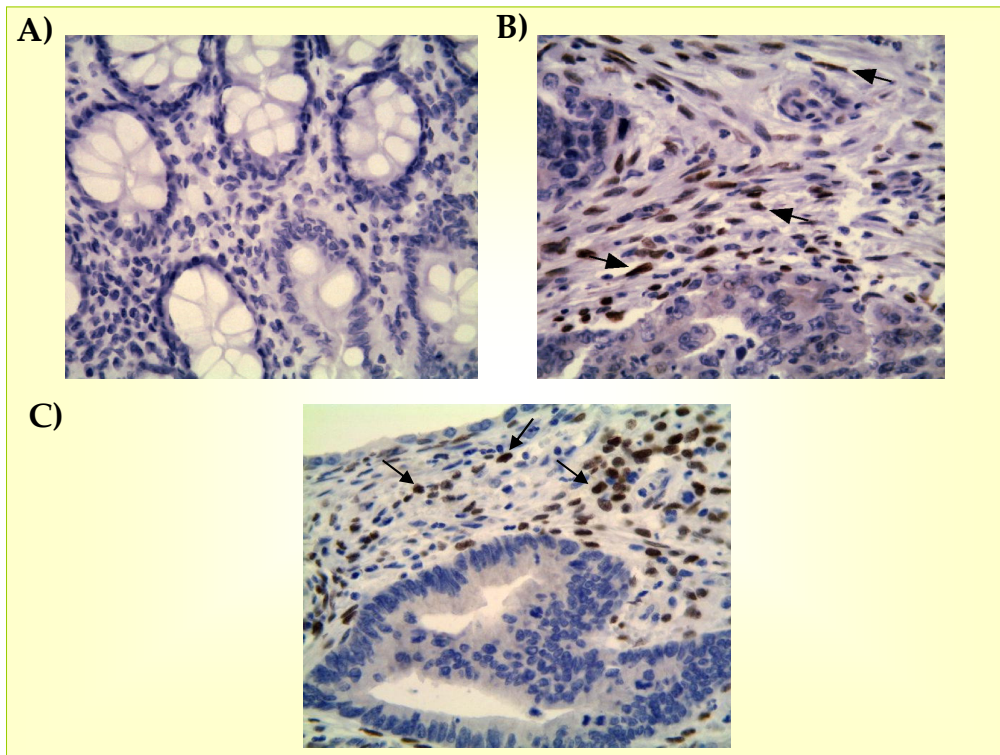
**Figura 33. Los niveles elevados de ARNm de TWIST1 se asocian con el sexo masculino y con la invasión a ganglios linfáticos.** Tabla de contingencia (panel derecho) y comparación de medias (panel izquierdo) donde se muestran los niveles relativos de ARNm de TWIST1 en las muestras tumorales (RQ  $\pm$  SEM) con respecto a **A)** el sexo de los pacientes y **B)** la invasión a ganglios linfáticos, con sus correspondientes valores de  $p$  (\* $p=0,01$  y  $p=0,036$ , respectivamente).

	Total	Expresión de TWIST1		valor <i>p</i>
	n=54	Baja (n=38 )	Alta (n= 16)	
Edad (años) media + SEM	71,09 + 1,29	70,76 +1,595	71,88 + 2,181	0,70*
Sexo, n(%)				
Hombres	36 ( 66,7)	21 (58,3)	15 (41,7)	0,010***
Mujeres	18 (33,3)	17 (94,4)	1 (5,6)	
Tumor primario (T), n(%)				
T2	5 (9,3)	4 (80,0)	1 (20,0)	0,734**
T3	40 (74,1)	27 (67,5)	13 (32,5)	
T4	9 (16,7)	7 (77,8)	2 (22,2)	
Nodulos linfáticos (N), n(%)				
N0	29 (53,7)	24 (82,8)	5 (17,2)	0,075**
N1	16 (29,6)	9 (56,3)	7 (43,8)	
N2	8 (14,8)	4 (50,0)	4 (50,0)	
NX	1(1,9)			
Invasión a ganglios, n(%)				
NO	29 (54,7)	24 (82,8)	5 (17,2)	0,036***
SÍ	24 (45,3)	13 (54,2)	11 (45,8)	
Grado histopatológico, n(%)				
G1	2 (3,7)	1 (50,0)	1 (50,0)	0,655**
G2	38 (70,4)	28 (73,7)	10 (26,3)	
G3	14 (25,9)	9 (64,3)	5 (35,7)	
Tipo de cáncer colorrectal, n(%)				
Cáncer de colon	35 (64,8)	23 (65,7)	12 (34,3)	0,365***
Cáncer de recto	19 (35,2)	15 (78,9)	4 (21,1)	
Invasión linfo-vascular, n(%)				
NO	19 (35,2)	14 (73,7)	5 (26,3)	0,299***
SÍ	17 (31,5)	9 (52,9)	8 (47,1)	
Sin información	18 (33,3)			
* T de Student				
** Test de Chi Cuadrado				
*** Test exacto de Fisher				

**Tabla 12. Datos clínico-patológicos de los 54 pacientes con cáncer colorrectal analizados para los niveles de expresión de TWIST1.** Se muestran los valores obtenidos tras realizar las tablas de contingencia entre los parámetros clínico-patológicos y la alta o baja expresión de TWIST1 (establecido el punto de corte en un valor de RQ=6,36, que presenta un 82,8% de sensibilidad). Se muestra el valor *p* del test estadístico aplicado en cada caso.

Los datos obtenidos para la expresión de TWIST1 no presentaban correlación con la expresión de Cdc42 (datos no mostrados). Por tanto, estos resultados desvelan de forma novedosa que la sobreexpresión de TWIST1 parece ser crucial en el proceso de invasión a ganglios linfáticos, posiblemente por su papel en la transición epitelio-mesénquima.





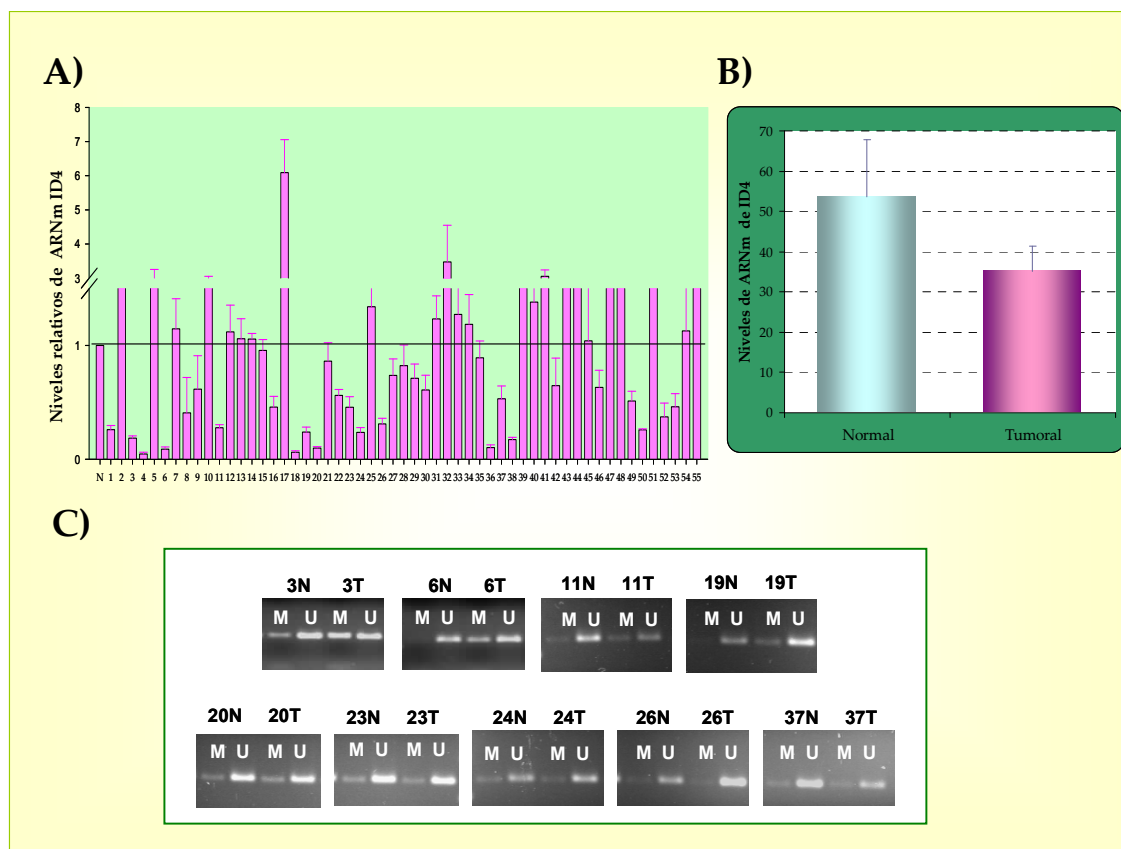
**Figura 34. Análisis por inmunohistoquímica de la expresión de Twist en cáncer colorrectal.** Se muestran resultados representativos de este estudio. Se observa en **A)** la ausencia de expresión de Twist en tejido normal y en **B)** y **C)** expresión de Twist en tejidos tumorales. Las flechas indican células teñidas positivamente para Twist, que presentan características fenotípicas de célula estromal.

#### *5.12.5 La pérdida de expresión de ID4 se asocia a la sobreexpresión de Cdc42 en las muestras tumorales analizadas de pacientes con cáncer colorrectal*

Los niveles de expresión del gen ID4 fueron analizados por PCR a tiempo real en muestras tumorales de 55 pacientes con cáncer colorrectal. Se observó que ID4 presentaba niveles disminuidos en 30 de los 55 tejidos tumorales comparados con los tejidos normales correspondientes (Figura 35A y B), dato que se encuentra en consonancia con estudios previos (Umetani *et al.*, 2004).

Para comprobar si se trataba de un mecanismo de silenciamiento epigenético, como ya se había observado en líneas celulares derivadas de tumores colorrectales, se realizó un análisis por MSP de la región promotora de ID4 en tejidos tumorales donde se había detectado la reducción de la expresión de este gen con respecto al tejido normal (Figura 35C). Sin embargo, no se observó una correlación entre la metilación del promotor y el silenciamiento transcripcional del gen ID4. Lo que se encontró, principalmente, fue un patrón general de bandas positivas tanto para la forma M como U en ambos tejidos, tumoral y normal. No se encontró ningún caso donde sólo presentase banda en M en el

tejido tumoral y se dieron muy pocos casos donde se observase sólo banda en U en el tejido normal (Figura 35C).

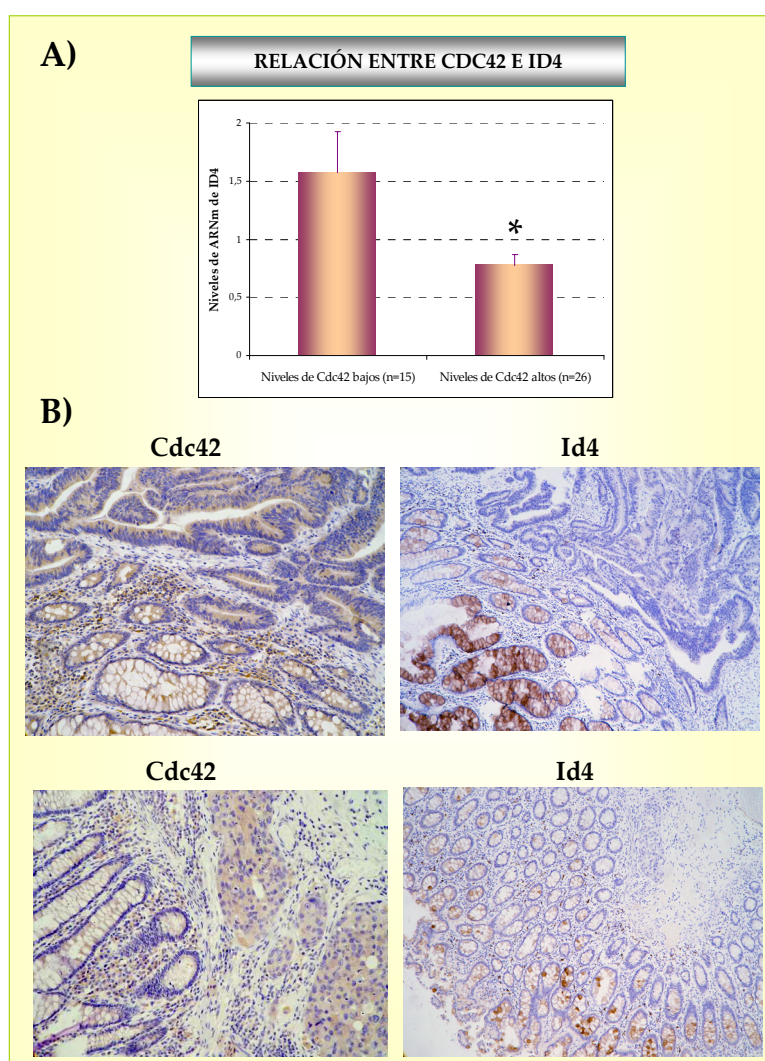


**Figura 35. ID4 se encuentra disminuido en las muestras tumorales analizadas de pacientes con cáncer colorrectal.** A) El ARN total extraído de muestras de tejido tumoral y normal adyacente al tumor de 55 pacientes, se analizó por RT-PCR a tiempo real utilizando una sonda Taqman específica para ID4. Los datos se representan como los niveles de ARNm de ID4 normalizados con ARN ribosomal 18S y relativos a la expresión en su correspondiente tejido normal, obtenidos por el método "RQ". El valor de los tejidos normales fue relativizado a "1" indicado como "N" y la línea horizontal. La desviación estándar se representa como  $RQ_{max}-RQ$ . B) Niveles de ARNm de ID4 normalizados con ARN ribosomal 18S en todas las muestras normales comparadas con las tumorales, según el método de "AQ". Los datos representados corresponden a la media  $\times 10^7 \pm SEM$ . C) Ejemplos representativos del análisis por MSP del estado de metilación del promotor de ID4 de tumores colorrectales comparados con su respectivo tejido normal adyacente. El ADN genómico extraído de las muestras de tejido fue modificado con bisulfito y amplificado por PCR con los correspondientes oligos específicos para metilación (M) y no metilación (U). Se utilizaron los controles indicados en el apartado de Materiales y Métodos (resultados no mostrados).

A la hora de estudiar la relación de este silenciamiento transcripcional con las características clínico-patológicas de los tumores de los 55 pacientes, no se encontró ninguna asociación significativa (datos no mostrados).

Sin embargo, se descubrió que existía una correlación significativa entre la sobreexpresión de Cdc42 y el silenciamiento de ID4 ( $p=0,008$ ). Así, la mayoría de los casos de sobreexpresión de Cdc42 presentaban menores niveles de expresión de ID4 que el tejido normal. En cambio, en los casos donde Cdc42 se encontraba reducido, los niveles de ARNm de ID4 en las muestras tumorales eran superiores al tejido normal de forma general

(Figura 36A). Adicionalmente, se realizaron experimentos de inmunohistoquímica en algunos casos representativos donde se había encontrado dicha correlación, observándose que la tinción de Cdc42 e Id4 era mutuamente excluyente, es decir, Id4 presentaba una tinción positiva en el tejido normal donde Cdc42 no se expresaba, y en cambio, en el tejido tumoral del mismo paciente, se encontró tinción positiva para Cdc42 mientras que no se observaba expresión de Id4 (Figura 36B). Estos resultados refuerzan la correlación encontrada entre Cdc42 e ID4 y sugieren una relación funcional entre ambas proteínas en este tipo tumoral.



**Figura 36. Asociación entre la expresión de ID4 y de Cdc42 en las muestras de pacientes con cáncer colorrectal. A)** Comparación de medias de los niveles relativos de ARNm de ID4 en las muestras tumorales en relación con los niveles, elevados o reducidos, de proteína Cdc42, estableciendo como punto de corte el valor de Cdc42 de 1,5 (\*,  $p=0,008$ ). **B)** Ejemplos representativos del análisis por inmunohistoquímica de la expresión de Cdc42 e Id4 en muestras de tejido procedente de dos pacientes. Cada caso ilustra la tinción mutuamente excluyente de ambas proteínas, observándose tinción positiva de Cdc42 en la región tumoral, mientras que Id4 presenta una expresión positiva en el tejido normal adyacente.

En conclusión, estos resultados revelan una fuerte correlación entre la expresión de Cdc42 y la regulación transcripcional de ID4 en muestras clínicas. Estas evidencias están en consonancia con los datos obtenidos en la línea celular SW620, y refuerzan la idea de que uno de los mecanismos por los cuales Cdc42 podría favorecer el desarrollo y la progresión del cáncer colorrectal, es a través del silenciamiento de genes supresores tumorales.



## **DISCUSIÓN**



## 6 Discusión

### 6.1 Expresión de Cdc42 en cáncer colorrectal y su asociación con parámetros clínico-patológicos

Cdc42, uno de los miembros de la familia Rho mejor estudiados, está implicado en un gran número de funciones celulares, incluyendo la organización del citoesqueleto de actina, crecimiento y mielinización axonal, migración y quimiotaxis, la polaridad celular, el tráfico vesicular, regulación del ciclo celular, la determinación del linaje celular y regulación de la transcripción génica (Heasman & Ridley, 2008).

Como otros miembros Rho, la proteína Cdc42 también se ha asociado con el proceso carcinogénico. Dependiendo del contexto celular, esta GTPasa puede desempeñar funciones pro-oncogénicas o anti-oncogénicas (Vega & Ridley, 2008). En cuanto a sus funciones asociadas con la promoción tumoral, destacan sus papeles en ciclo celular, regulación de la expresión génica, tráfico vesicular y migración e invasión celular (Benitah *et al.*, 2004; Gomez del Pulgar *et al.*, 2005). En tumores humanos, se ha hallado una expresión aberrante de la proteína Cdc42 en cáncer de mama (Fritz *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 1999), cáncer testicular (Kamai *et al.*, 2004), carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Abraham *et al.*, 2001) y en melanoma (Tucci *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias acerca del comportamiento de Cdc42 en cáncer colorrectal.

En este trabajo se aporta el primer estudio de los niveles de expresión de la proteína Cdc42 en un amplio número de muestras de pacientes diagnosticados con CCR. Los resultados obtenidos demuestran que Cdc42 se encuentra sobreexpresado de forma significativa en el cáncer colorrectal humano ( $p < 0,0001$ ). En este sentido, se ha observado que en el 57,9% de los casos, Cdc42 se encuentra incrementado en las muestras tumorales. Asimismo, en el análisis de la expresión de Cdc42 en un panel de 9 líneas derivadas de cáncer colorrectal comparado con los niveles presentados por una línea normal de colon, se ha detectado una sobreexpresión de la proteína en un 44,4% de las líneas tumorales. Estos porcentajes son comparables con los obtenidos para oncogenes tan importantes como KRAS (38-50%) (Vogelstein *et al.*, 1988) o AKT (57%) (Roy *et al.*, 2002), los cuales se encuentran activados en CCR. Estudios previos en muestras invasivas de tumores de mama y colon, donde se analizan posibles mutaciones puntuales de RhoA, Rac1 y Cdc42 que podrían dar lugar a la expresión de formas constitutivamente activas, demuestran que, al contrario que KRAS y p53, ninguna de las Rho GTPasas analizadas se encuentra mutada

en su región codificante (Rihet *et al.*, 2001). Esto sugiere, como ya se ha encontrado en otros tipos tumorales, que la posible contribución funcional de Cdc42 en la carcinogénesis colorrectal es a través de una sobreexpresión de la proteína y no de mutaciones que activan a esta GTPasa, lo cual refuerza los hallazgos obtenidos.

La familia de GTPasas Rho se ha implicado en diferentes etapas del desarrollo tumoral (Vega & Ridley, 2008). En este trabajo, se ha observado que la sobreexpresión de Cdc42 se asocia de forma significativa con el incremento del número de nódulos invadidos por células tumorales y con el grado de diferenciación del tumor. Además, se ha visto que las líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal humano analizadas, con un aumento en sus niveles de Cdc42, se correspondían a los estadios clínicos II y III o a un carcinoma, etapas que se asocian con la adquisición de un fenotipo invasivo hacia ganglios linfáticos regionales y donde se produce una pérdida de la diferenciación celular. La asociación de los niveles de Cdc42 con la invasión a ganglios linfáticos podría explicarse por el papel de esta GTPasa en migración e invasión celular (Friedl & Wolf, 2003; Gadea *et al.*, 2008; Gaggioli *et al.*, 2007) y en la EMT (Patel *et al.*, 2005; Vega & Ridley, 2008). Asimismo, la asociación significativa de la expresión de Cdc42 con el grado de diferenciación del tumor puede ser debida a su papel en el control de los cambios en el citoesqueleto de actina y en el establecimiento de la polaridad celular (Braga & Yap, 2005; Etienne-Manneville, 2004; Wu *et al.*, 2007). En el sistema celular presentado en este estudio, el análisis del perfil de expresión génica por microarrays en los clones estables para niveles diferenciales de Cdc42 generados a partir de la línea SW620, derivada de un adenocarcinoma colorrectal, ha revelado que un número significativo de genes asociados con funciones de ensamblaje, morfología, organización y movimiento celular se encontraban alterados por Cdc42. Esta serie de evidencias podrían explicar la asociación encontrada entre Cdc42 y la invasión a ganglios linfáticos y el grado de diferenciación tumoral en este tipo de cáncer.

## **6.2 Mecanismos moleculares relacionados con el efecto oncogénico de Cdc42 en cáncer colorrectal**

La identificación de la sobreexpresión de Cdc42 en muestras de pacientes con CCR y su asociación con parámetros clínico-patológicos, que conllevan a un fenotipo tumoral más agresivo, sugiere un papel oncogénico de esta GTPasa en este tipo de cáncer. En este trabajo se demuestra que la presencia de Cdc42 es determinante en el crecimiento tumoral *in vivo*. Los transfectantes estables para el silenciamiento de la expresión de Cdc42 presentan una reducción en la velocidad del crecimiento tumoral en ratones



inmunodeprimidos. El análisis de los tumores generados en los clones para la interferencia de Cdc42 ha revelado que estos tumores recuperan la expresión de Cdc42 cuando se comparan con la línea control SW620. Esto significa que para el desarrollo de estos tumores *in vivo* se requiere la presencia de Cdc42, ya que sólo progresan aquellas células tumorales que cumplan este requisito. Estos resultados podrían estar apoyando la reciente hipótesis sobre las células madre cancerígenas, donde la expansión tumoral y metástasis parece depender de un grupo de células que actúan como células progenitoras (Visvader & Lindeman, 2008). En la línea celular SW620, las células con niveles reducidos de Cdc42 no son capaces de progresar por lo que sólo las células que posean niveles elevados de Cdc42 serán las que evolucionen. En este sentido, entre las funciones alteradas a nivel transcripcional en los transfectantes estables para los niveles de Cdc42, destacan el desarrollo embrionario, desarrollo celular y la organización y formación de tejidos, los cuales son aspectos que han sido atribuidos en gran medida a las células madre. La importancia de Cdc42 en la biología de las células madre también podría explicarse por el hecho de que los ratones KO para Cdc42 son letales en los estadios tempranos del desarrollo embrionario (Chen *et al.*, 2000). Sin embargo, nuestros hallazgos también serían compatibles con la teoría de la evolución clonal de los tumores, donde la sobreexpresión de Cdc42 daría una mayor capacidad proliferativa a las células que manifestaran este rasgo, siendo imprescindible para su propagación (Visvader & Lindeman, 2008).

Como ya se ha señalado, en los últimos años el conocimiento de la relación entre la regulación de la transcripción génica mediada por las GTPasas Rho y la consecuente función celular ha adquirido una gran importancia. Esto es debido a que muchas de las funciones que desempeñan las proteínas Rho en tumorigénesis están asociadas con mecanismos de señalización, que desembocan en una regulación transcripcional de genes clave en el desarrollo tumoral (Benitah *et al.*, 2004; Berenjeno *et al.*, 2007). El análisis global de la regulación transcripcional mediada por Cdc42 en la línea SW620 sugiere, de una forma novedosa, que esta GTPasa está implicada en la regulación de genes que se han asociado con funciones importantes en el desarrollo y progresión del CCR.

Fearon y Vogelstein describieron que en el desarrollo del cáncer colorrectal tiene lugar la acumulación de alteraciones genéticas que dan como resultado la activación aberrante de oncogenes y la desactivación de genes supresores, esta última alteración es la más predominante. En este trabajo se ha encontrado que Cdc42 podría ser capaz de incrementar la transcripción de posibles oncogenes y que es capaz de disminuir la expresión de posibles genes oncosupresores en CCR. Durante el proceso de formación de

la neoplasia tienen lugar mutaciones, deleciones cromosómicas y silenciamiento epigenético en genes que son claves en rutas de señalización fundamentales para la transformación tumoral (Fearon & Vogelstein, 1990). Los resultados presentados en este estudio revelan que Cdc42 reprime la transcripción de los genes ID4, p16INK4a, CACNA2D2, TWIST1 y KIAA1456 en la línea celular SW620, los cuales son genes candidatos a ser genes oncosupresores en este tipo tumoral. Este silenciamiento transcripcional mediado por Cdc42, se debe a la hipermetilación de los promotores de ID4, p16INK4a y TWIST1 y a un mecanismo diferente y aún no caracterizado para los genes CACNA2D2 y KIAA1456. Para el estudio de la relevancia de estos genes como supresores tumorales en CCR, se han llevado a cabo análisis de su expresión transcripcional tanto en un panel de líneas celulares como en tumores colorrectales humanos. Asimismo se ha investigado si la regulación transcripcional de estos genes mediada por Cdc42 es un evento general en CCR o es exclusivo de la línea SW620.

### **6.3 Cdc42 silencia la expresión de CACNA2D2 y KIAA1456 en CCR**

El gen CACNA2D2 codifica para una subunidad de un complejo de canal de calcio dependiente de voltaje. Los canales de calcio median la entrada de iones de calcio en la célula cuando se produce la polarización de la membrana. El gen CACNA2D2 se localiza en la región cromosómica 3p21.3, la cual presenta de forma frecuente alteraciones en cáncer, incluyendo deleciones homocigóticas, LOH y deficiencias de expresión de los genes englobados en esta zona por diversos mecanismos (Ji *et al.*, 2005). El reestablecimiento de genes defectivos de esta región cromosómica suprime el crecimiento tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Ji *et al.*, 2002). Esta serie de evidencias, apuntan a que los genes 3p21.3 actúan como potenciales genes supresores tumorales en cáncer (Zabarovsky *et al.*, 2002). En concreto, la expresión del ARNm de CACNA2D2 se encuentra reducida o ausente en líneas de cáncer de pulmón (Lerman & Minna, 2000). Consistentemente, la expresión exógena de CACNA2D2 induce apoptosis en líneas tumorales de pulmón (Carboni *et al.*, 2003), lo que sugiere una posible asociación entre la señalización del calcio y el desarrollo del cáncer (Gao *et al.*, 2000). Sin embargo, el papel de CACNA2D2 en cáncer colorrectal aún no ha sido descrito.

Aún se desconoce si existen mecanismos donde la expresión de CACNA2D2 esté regulada por oncogenes. En este trabajo se aporta la primera evidencia que apoya este tipo de regulación, ya que Cdc42 es capaz de regular la expresión transcripcional de

CACNA2D2 en la línea de cáncer colorrectal SW620, pudiendo estar contribuyendo de esta forma a la transformación en CCR.

Se ha descrito que CACNA2D2 se silencia a través de la hipermetilación de su promotor en diversos tipos de cáncer (Chow *et al.*, 2004; Hesson *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2005), sin embargo no se ha encontrado que Cdc42 estuviese silenciando a este gen por dicho mecanismo en la línea celular de estudio. Por tanto, es preciso estudiar otros posibles mecanismos de regulación transcripcional implicados en la represión de CACNA2D2 por Cdc42, incluyendo tanto la activación de represores transcripcionales como la represión de activadores transcripcionales. El análisis de los 640 pb, correspondientes a la región promotora de CACNA2D2, con el programa Genomatix (<http://www.genomatix.de/>) (Cartharius *et al.*, 2005), identificó diversos lugares de unión a factores de transcripción. Una de las familias de factores hipotéticos detectada que podría estar mediando la transcripción de este gen, es la familia de represores transcripcionales tipo-Krüppel como KLF3, KLF15, ZF5 o ZNF219. En la línea SW620, KLF3, un posible oncogen (Kirberg *et al.*, 2005; Lyng *et al.*, 2006), se encuentra sobreexpresado cuando los niveles de Cdc42 están incrementados (Tabla 5), coincidiendo con el silenciamiento transcripcional de CACNA2D2. Sin embargo, no se validaron los cambios del gen KLF3 observados en los microarrays por PCR cuantitativa entre los grupos de sobreexpresión e interferencia de Cdc42. Por tanto, serían necesarios otro tipo de estudios, como el análisis de la regulación su actividad o localización subcelular para elucidar este posible mecanismo.

Adicionalmente, en el análisis estadístico de la asociación entre Cdc42 y CACNA2D2 en muestras clínicas de pacientes con cáncer colorrectal, aunque no se alcanza un valor *p* significativo se sugiere una tendencia, ya que el 73,1% de los casos de sobreexpresión de Cdc42 presenta silenciamiento de CACNA2D2. Esta asociación ha podido verse enmascarada debido a las limitaciones impuestas por la variabilidad genética y la heterogeneidad existente en las muestras clínicas. Por tanto, se hace preciso realizar estudios más exhaustivos acerca de la regulación que media Cdc42 sobre este gen, ya que los posibles factores que conectan a ambas moléculas podrían estar alterados en algunas de las muestras clínicas dando lugar a que este tipo de regulación no ocurra.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran por primera vez que el gen CACNA2D2 se encuentra silenciado de forma significativa en líneas celulares de cáncer colorrectal y en los tejidos tumorales de pacientes con CCR. Además, en el análisis de muestras clínicas, se ha visto que este silenciamiento se asocia con el incremento del número de ganglios linfáticos afectados por células tumorales y con la infiltración linfo-

vascular. La polaridad celular debida a la entrada de calcio en la célula mediada por CACNA2D2 podría explicar la asociación con estos parámetros, ya que uno de los primeros pasos para la migración celular hacia ganglios linfáticos y el torrente sanguíneo es la EMT donde la alteración de la polaridad es un evento típico de este proceso (Thiery, 2003). Se ha demostrado que la invasión a ganglios linfáticos regionales y la infiltración linfo-vascular podrían afectar en la supervivencia de los pacientes con CCR (Compton *et al.*, 2000; O'Connell *et al.*, 2004). Por ello, sería necesario estudiar la relación de la expresión de CACNA2D2 con la evolución clínica de los pacientes para concluir su posible valor pronóstico en CCR.

KIAA1456 codifica para una proteína hipotética. Este gen se ha descrito previamente como un posible gen oncosupresor inactivado a través de un silenciamiento transcripcional en 9 de 12 tumores colorrectales esporádicos (Flanagan *et al.*, 2004). Flanagan y colaboradores encontraron que en la línea SW620, donde existía una LOH en el cromosoma 8p, la transferencia de la región 8p21-23.1 suprimía la tumorigénesis *in vitro* e *in vivo*. Estos mismos autores detectaron que uno de los genes que se localizaban en dicha región era KIAA1456, proponiéndolo como un candidato a gen oncosupresor. Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman dichos datos, ya que se ha encontrado que KIAA1456 se encuentra silenciado en todas las líneas de cáncer colorrectal examinadas y en muestras de pacientes con CCR con una incidencia del 41,9%.

Hasta la fecha, no existen trabajos donde se investigue la función de este gen ni si existe algún tipo de regulación sobre su expresión. Por primera vez, se propone un mecanismo de regulación de la expresión transcripcional de este posible gen oncosupresor donde Cdc42 suprime su expresión, pudiendo favorecer así el proceso carcinogénico al menos en CCR. Debido a que la disminución de los niveles transcripcionales de KIAA1456 en muestras clínicas se asocia con el grado de diferenciación, se propone que esta proteína de función desconocida pueda ser clave en la diferenciación celular.

En la línea SW620, el tratamiento con 5-Azacidina reestablece la expresión de KIAA1456, sugiriendo que este gen podría regular su expresión a través de la metilación de su promotor de forma dependiente a Cdc42. Sin embargo, tras el análisis por BSP en los transfectantes estables para niveles diferenciales de Cdc42 no se ha observado tal correlación. Estos resultados también están en consonancia con los obtenidos por Flanagan y colaboradores (Flanagan *et al.*, 2004). Además, estos autores tampoco encontraron mutaciones somáticas en este gen en las líneas derivadas de cáncer colorrectal que analizaron. Por tanto, el mecanismo de silenciamiento de este gen continúa sin resolverse.

Se ha demostrado que el 60% de los genes inducidos tras el tratamiento con 5-Azacitidina en líneas derivadas de cáncer de vejiga no contenían promotores con islas CpG (Liang *et al.*, 2002), sugiriendo que el incremento de KIAA1456 tras el tratamiento con este agente desmetilante podría ser una respuesta secundaria por el incremento de la expresión de factores de transcripción que regulan la expresión de KIAA1456 (Karpf *et al.*, 1999). Por tanto, Cdc42 podría estar silenciando a KIAA1456 a través de mecanismos que medien la activación de un represor transcripcional o la inactivación de un activador transcripcional, esta última a través de la hipermetilación del promotor. Tras el análisis con el programa Genomatix de la hipotética región promotora de KIAA1456, se encontraron posibles sitios de unión a diferentes factores de transcripción, sin embargo ninguno de ellos había sido previamente descrito como inactivado por hipermetilación. En cambio, se detectaron posibles sitios de unión de la proteína YY1, la cual puede actuar como un represor transcripcional y su sobreexpresión se ha encontrado en varios tipos tumorales (Gordon *et al.*, 2006). Este gen se encontró alterado por Cdc42 en la línea SW620 (Tabla 5) con lo que podría ser un candidato para explicar el mecanismo de regulación dependiente de Cdc42. Sin embargo, el gen YY1 no presentaba cambios significativos cuando se validó su expresión transcripcional por PCR a tiempo real, con lo cual sería necesario estudiar otro tipo de regulación distinta a la transcripcional que se encuentre alterada por Cdc42.

## 6.4 Cdc42 silencia la expresión de genes supresores mediante mecanismos epigenéticos

### 6.4.1 Silenciamiento de p16INK4a

El inhibidor de ciclo celular p16INK4a se une a las quinasas dependientes de ciclina, CDK4 y CDK6, interfiriendo con la formación de los complejos con ciclinas lo que da lugar al bloqueo de la progresión G1/S. La inactivación de la expresión de p16INK4a permite a una célula cancerígena salir de la senescencia y proliferar de forma continuada. Además, ratones deficientes en p16INK4a desarrollaban tumores espontáneos en etapas muy tempranas y presentaban una alta sensibilidad a los carcinógenos, sugiriendo que p16INK4a es un gen supresor tumoral (Serrano *et al.*, 1996). Este gen se ha observado disminuido en un gran número de tipos de cáncer donde la metilación de su promotor es una de las principales causas de este silenciamiento, incluyendo en cáncer colorrectal (Esteller, 2008; Herman *et al.*, 1995). Existen evidencias que afirman que el promotor de p16INK4a se encuentra metilado en un 29-55% de los tejidos primarios de CCR (Guan *et al.*, 1999).

La pérdida general de expresión de p16INK4a en el panel de líneas celulares derivadas de CCR analizadas se correlaciona con el estado de metilación de su promotor, lo que está en consonancia con trabajos previos (Tominaga *et al.*, 1997). La interferencia de Cdc42 en la línea SW620 recupera la expresión transcripcional de este gen por desmetilación del promotor de p16INK4a. Estos resultados demuestran que Cdc42 está implicado en el proceso de metilación de dicho promotor en la línea celular SW620.

De forma paradójica se ha encontrado que la expresión transcripcional de p16INK4a está significativamente aumentada en las muestras tumorales de CCR analizadas. En principio, estos resultados parecen incongruentes debido al papel de p16INK4a como gen oncosupresor. Sin embargo, esta sobreexpresión ya ha sido descrita en CCR por otros grupos (Dai *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005; Ohhara *et al.*, 1996; Palmqvist *et al.*, 2000). Además, el análisis inmunohistoquímico de la expresión de p16 en los tejidos tumorales de pacientes con CCR, indica que la expresión positiva de p16 es específica de zonas muy concretas del tumor que parecen ser los bordes invasivos. Estas zonas de forma general presentan una actividad proliferativa baja que se correlaciona con unos elevados niveles de la proteína p16 comparado con los bajos niveles presentados por el tejido normal (Palmqvist *et al.*, 2000). Por otro lado, el porcentaje de muestras con los niveles de p16 reducidos obtenido (20%) se asemeja al porcentaje de silenciamiento de p16 en CCR encontrado por otros investigadores (Liang *et al.*, 1999).

La relación encontrada entre Cdc42 y p16INK4a en la línea SW620 no se confirma en las muestras clínicas. Sin embargo, como ya se ha indicado, la limitación impuesta por la variabilidad genética y la heterogeneidad existente en las muestras de pacientes, hace suponer que esta relación podría darse por lo que habría que estudiar en mayor detalle los mecanismos moleculares implicados en esta relación.

#### 6.4.2 Silenciamiento de TWIST1

TWIST1 es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas de tipo hélice-bucle-hélice básico (bHLH), implicado en el control del movimiento celular y de la reorganización tisular durante la embriogénesis temprana debido a su papel en la regulación de la EMT (Chen & Behringer, 1995). A pesar de haberse descrito en varios tipos tumorales la hipermetilación de su promotor (Abe *et al.*, 2008; Fackler *et al.*, 2003; Fackler *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2008; Sova *et al.*, 2006; Tsou *et al.*, 2007), se ha demostrado que TWIST1 actúa como un oncogen por estar implicado en la inhibición de la apoptosis (Maestro *et al.*, 1999) y la invasión tumoral en un gran número de tipos tumorales (Vernon

& LaBonne, 2004; Yang *et al.*, 2004). Sin embargo, aún no se conoce su papel concreto en el desarrollo del CCR.

En este trabajo se demuestra que en la línea SW620, Cdc42 es capaz de silenciar la expresión del candidato a gen oncosupresor TWIST1 mediante la metilación de su promotor. Sin embargo, a pesar de detectar inicialmente que TWIST1 se encuentra silenciado en todas las líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal analizadas, esta circunstancia no se ve reflejada en las muestras clínicas de CCR. Precisamente, lo que se ha observado de forma novedosa para este tipo tumoral, es que TWIST1 se encuentra sobreexpresado de forma significativa en el 77,8% de las muestras tumorales analizadas, y que dicha sobreexpresión se asocia con la invasión a ganglios linfáticos y con el sexo masculino. Estos resultados están en consonancia con lo observado en un gran número de tipos de cáncer, donde se ve un aumento de los niveles de TWIST1 en las muestras tumorales y su asociación con parámetros de malignidad (Yang *et al.*, 2006a). La gran mayoría de los efectos observados debido a la sobreexpresión de este factor de transcripción se deben a su papel en la EMT, debido, entre otras razones, a su papel en la represión transcripcional de la E-cadherina (Vesuna *et al.*, 2008). Los datos presentados de la asociación con la invasión de ganglios regionales y de la expresión específica en células con un fenotipo invasivo, sugieren que TWIST1 juega un papel fundamental en el proceso de EMT, uno de los primeros pasos de la metástasis en CCR.

La interacción entre las células tumorales y el microambiente estromal produce efectos sustanciales en el comportamiento de las células tumorales, influyendo en la adhesión celular y en la EMT de las mismas. Numerosos estudios han demostrado que los componentes del microambiente, como el colágeno fibrilar o factores de crecimiento, están implicados de la dediferenciación de las células epiteliales que está acompañada de una reducción de los complejos de adhesión formados por E-cadherina así como una disminución de la concentración de esta proteína (Giehl & Menke, 2008). La reducción de la adhesión influye en la integridad tisular y permite a las células tumorales diseminarse desde el tumor primario, representando el primer paso de la metástasis. La expresión de TWIST1 podría activarse por señales procedentes del microambiente estromal para reprimir la expresión de E-cadherina y promover la invasión celular. Esta hipótesis explicaría la diferencia de expresión encontrada *in vitro*, en las líneas celulares que crecen en una placa de cultivo sin un microambiente tisular, de la encontrada *in vivo*, en muestras clínicas, donde TWIST1 se sobreexpresa promoviendo la invasión a nódulos linfáticos.

Los resultados encontrados en la línea SW620, donde Cdc42 reprime epigenéticamente la expresión de TWIST1, no se confirman en las muestras de pacientes, lo que indica que el proceso de regulación es más complejo e implica otros componentes adicionales no identificados. Por tanto, sería necesario estudiar más en profundidad la posible asociación entre Cdc42 y TWIST1.

#### 6.4.3 Silenciamiento de la expresión de ID4

El gen ID4 es un miembro de la familia de los inhibidores de unión al ADN (ID), el cual, por heterodimerización con factores de transcripción bHLH, inhibe la unión al ADN y por tanto la transactivación transcripcional de los mismos. Se ha descrito que este gen se encuentra inactivado debido a la hipermetilación de su promotor en un gran número de tumores humanos, incluyendo adenocarcinoma gástrico (Chan *et al.*, 2003), carcinoma colorrectal (Umetani *et al.*, 2004), cáncer de mama (Noetzel *et al.*, 2008; Umetani *et al.*, 2005), leucemias (Yu *et al.*, 2005), linfomas (Hagiwara *et al.*, 2007), colangiocarcinoma (Uhm *et al.*, 2008) y adenocarcinoma de esófago (Smith *et al.*, 2008). Además, este silenciamiento epigenético se ha asociado con un peor pronóstico (Noetzel *et al.*, 2008; Umetani *et al.*, 2004), con la diferenciación tumoral (Umetani *et al.*, 2004) y con la invasión a ganglios linfáticos (Umetani *et al.*, 2005). El silenciamiento transcripcional de ID4 encontrado en este trabajo en líneas celulares derivadas de tumores colorrectales humanos y en muestras de pacientes con CCR, que avalan su papel como gen oncosupresor, confirman resultados ya publicados por otros grupos (Umetani *et al.*, 2004). Además, los resultados presentados en este estudio demuestran, de forma novedosa, que Cdc42 reprime transcripcionalmente a ID4 en CCR, sugiriendo que una de las contribuciones de Cdc42 en el desarrollo de este tipo de cáncer es por la inactivación del gen oncosupresor ID4. Se ha descrito que ID4 es clave en procesos de desarrollo embrionario (Jen *et al.*, 1996; Kee & Bronner-Fraser, 2001) y diferenciación celular (Kondo & Raff, 2000), funciones en las que Cdc42 también es importante, por lo que se podría explicar su asociación con la tumorigénesis.

Además, se demuestra que el silenciamiento de ID4 mediado por Cdc42 es debido a la hipermetilación de su promotor en la línea SW620. Sin embargo, la inactivación de la expresión de este gen no ha podido ser explicada por la hipermetilación de su promotor en muestras de pacientes, ya que, tras el análisis por MSP, se observa un patrón general de bandas positivas tanto para la forma M como para la U. Se han encontrado muy pocos casos donde el promotor estuviese no metilado en el tejido normal y no se ha detectado ningún caso donde el promotor se presentase exclusivamente metilado en el tejido tumoral.



Este resultado puede ser debido al método de obtención de las muestras, ya que el tejido normal procede de la mucosa normal adyacente al tumor, donde cabe la posibilidad de que pueda existir un pequeño número de células tumorales o pre-neoplásicas, donde tiene lugar el silenciamiento epigenético de genes (Baylin & Ohm, 2006; Ramirez *et al.*, 2008). Por otro lado, los tejidos además de contener las células epiteliales tumorales o normales del colon, contienen otros tipos celulares como células estromales y del sistema inmune. La MSP es un método altamente sensible para la detección de bajos niveles de metilación (o no metilación), y es capaz de detectar un molde de metilación (o no metilación) que sólo esté representado en un 0,1% de la muestra, por lo que es una técnica que puede dar lugar a falsos positivos (Cottrell & Laird, 2003). Ya que la hipermetilación del promotor de ID4 ha sido previamente descrita en muestras de pacientes con cáncer colorrectal (Umetani *et al.*, 2004), esta hipótesis podría ser la explicación más razonable a los resultados obtenidos. Por lo tanto, para poder confirmar estas teorías, sería necesario realizar estos análisis por métodos cuantitativos, es decir utilizando la técnica de MSP cuantitativa (Q-MSP), Q-MSP multiplex (QM-MSP), etc. (Kristensen *et al.*, 2008; Shames *et al.*, 2007). Otra forma más precisa de realizar estos experimentos sería analizando por MSP el promotor de ID4 en las células normales y tumorales procedentes de los tejidos de pacientes que hayan sido previamente aisladas por la técnica de captura por microdissección láser (LCM), lo que asegura la homogeneidad de la población celular (Greenspan *et al.*, 2006).

## **6.5 Hipótesis de regulación epigenética de ID4, TWIST1 y p16INK4a mediada por Cdc42**

Este trabajo aporta la primera evidencia de la represión transcripcional mediada por Cdc42 a través de la hipermetilación específica de promotores de genes oncosupresores como ID4 y p16INK4a y del gen TWIST1. El siguiente paso sería entender cómo Cdc42, una GTPasa localizada principalmente en membranas y en citoplasma, transduce una señal, directa o indirecta, que finalmente desemboca en un silenciamiento epigenético de estos genes. La hipermetilación de promotores de genes supresores tumorales es un evento frecuente en el origen y progresión de muchos tipos de cáncer (Jones & Baylin, 2002). Sin embargo, el mecanismo por el cual las islas CpG de los promotores de genes supresores se hipermetilan de forma selectiva y específica aún se desconoce. Una de las hipótesis iniciales que pudiese explicar el silenciamiento epigenético mediado por Cdc42 fue investigar la modulación de los niveles de las DNMTs. Se ha descrito una sobreexpresión de estas enzimas como un rasgo frecuente en cáncer (Jones & Baylin, 2002). Sin embargo no se

observaron diferencias significativas cuando se analizaron los niveles transcripcionales de las DNMTs en los clones estables. Otra posible teoría es que las regiones próximas a las islas CpG puedan ser secuencias nucleotídicas consenso, reconocidas por factores de transcripción específicos, los cuales son capaces de reclutar el complejo proteico de metilación. Con esta premisa se quiso investigar si Cdc42, que es capaz de regular la actividad de diversos factores de transcripción (Benitah *et al.*, 2004), podría tener que ver en este proceso. Para ello se realizó un estudio bioinformático de los promotores de los genes ID4, p16INK4a y TWIST1 usando el programa Genomatix con la finalidad de detectar secuencias de unión a factores de transcripción comunes en los tres promotores que podrían estar desempeñando ambos papeles, tanto de reconocer secuencias de ADN específicas como de reclutar a las enzimas DNMTs. Como resultado de este análisis, se encontraron secuencias consenso de unión a STAT3 y c-Myc.

STAT3 es un factor de transcripción que es activado por Cdc42 en distintos contextos celulares (Debidda *et al.*, 2005). Además se ha descrito que es capaz de reclutar a DNMT1 para el silenciamiento epigenético del gen SHP-1 (Zhang *et al.*, 2005). Para comprobar la hipótesis planteada, se realizaron ensayos de inmunodetección de las distintas formas fosforiladas de STAT3 en los transfectantes estables para la expresión o interferencia de Cdc42. No se encontraron diferencias significativas con los cambios de expresión de esta GTPasa Rho. Adicionalmente, se plantearon estudios *in vitro* de ensayos de retraso en la movilidad electroforética en gel (EMSA) para detectar la formación diferencial de complejos entre los grupos de transfectantes, usando como sondas de ADN los 5 sitios de unión a STAT3 localizados en el promotor de ID4. Sin embargo, no se logró encontrar ninguna diferencia. Para detectar específicamente a estos complejos en estos ensayos se usó el anticuerpo de frente a Dnmt1 para investigar si cambiaba la movilidad electroforética en los sitios de unión a STAT3. No se observaron cambios entre presencia o ausencia del anticuerpo, dando a entender que Dnmt1 no está presente en los complejos proteicos que se encuentran unidos a la secuencias de reconocimiento de STAT3. Esta batería de experimentos sugería que en el sistema de estudio, STAT3 no está implicado en la metilación al menos del promotor de ID4 dependiente de Cdc42.

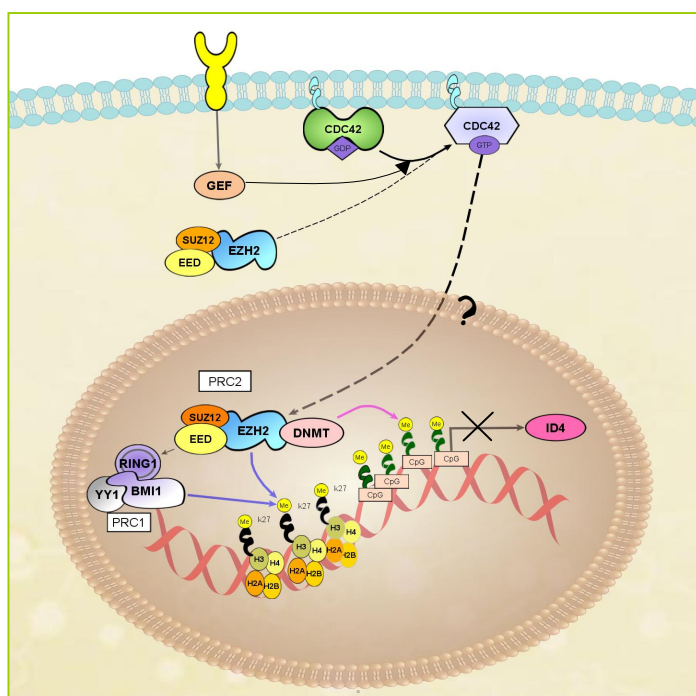
La proteína c-Myc es un factor de transcripción altamente implicado en el proceso de carcinogénesis. En este contexto, puede actuar tanto de represor como de activador transcripcional de genes clave en el proceso de transformación. Entre los mecanismos de silenciamiento transcripcional, se ha descrito que c-Myc es capaz de formar un complejo ternario con Miz-1 y DNMT3a y silenciar la expresión de p21Cip1 de una forma

dependiente de metilación del ADN (Brenner *et al.*, 2005). Como primera aproximación, se realizaron experimentos para comprobar si los niveles de ARNm y de proteína total o nuclear de c-Myc se encontraban alterados por la sobreexpresión o interferencia de Cdc42. Sin embargo, este análisis no nos permitió sacar conclusiones definitivas al no observar diferencias significativas. Por tanto, serían necesarios otros experimentos como inmunoprecipitación de cromatina, co-inmunoprecipitación, etc para confirmar la hipótesis planteada.

En los últimos años, se ha demostrado que la metilación del ADN tiene lugar dentro de un complejo de cromatina, en el cual además de modificarse las islas CpG, también está siendo alterada la estructura de las histonas. Se ha descrito que ambos procesos se hallan alterados en cáncer (Esteller, 2008). Para el reclutamiento de DNMTs a loci particulares es necesario que la cromatina se encuentre modificada y la presencia de proteínas remodeladoras (Jones & Baylin, 2002). En concreto, se ha demostrado que las modificaciones de histonas marcan a un gen para ser hipermetilado (Bachman *et al.*, 2003; Hernandez-Munoz *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2003; Vire *et al.*, 2006). El complejo de proteínas encargada de realizar las modificaciones epigenéticas específicas en las colas de las histonas se denomina polycomb (PcG). Estas modificaciones gobiernan eventos claves en el desarrollo de organismos, además de contribuir en el control del crecimiento y diferenciación de células normales. Estudios bioquímicos y genéticos revelan que las proteínas PcG forman al menos dos complejos multiproteicos separados en células de mamíferos: el complejo represor polycomb 2 (PRC2) y el complejo represor polycomb 1 (PRC1) (Gil *et al.*, 2005). La alteración en alguno de los genes integrantes de esta familia como son BMI1, CBX4, CBX7, YY1 y EZH2 se ha asociado con el proceso de carcinogénesis (Sparmann & van Lohuizen, 2006).

Existen una serie de evidencias donde se relaciona a los factores BMI1 y YY1 con la represión transcripcional de p16INK4a (Kim *et al.*, 2004; Kotake *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008) e ID4 (Affar el *et al.*, 2006; Dutton *et al.*, 2007), sin embargo no existen artículos donde se investigue la regulación de TWIST1 con los complejos polycomb. Además, en la lista de los 190 genes alterados transcripcionalmente por Cdc42 en los clones estables se ha encontrado que el gen PCGF3, un miembro del grupo polycomb con una función aún no caracterizada, está seleccionado como un gen con niveles disminuidos cuando Cdc42 está interferido, con lo que sería un gen interesante para ser validado por PCR a tiempo real para el estudio de esta hipótesis. Por otro lado, recientemente se ha descrito que EZH2, una histona lisina metiltransferasa esencial en la formación del complejo PRC2, es capaz de

regular la activación de Cdc42 en el citoplasma y alterar el citoesqueleto de actina en fibroblastos (Su *et al.*, 2005). Todas estas evidencias han sugerido plantear la hipótesis de que este mecanismo de regulación epigenética podría ser mediado por EZH2, BMI1 y YY1 debido a su relación indirecta con Cdc42, ID4 y p16INK4a. Esta hipótesis abriría una nueva posibilidad de ruta de señalización que finalizaría en una regulación epigenética. Hasta la fecha no se han descrito mecanismos de transmisión de señales que desemboquen en una alteración en el patrón de metilación de las islas CpG en promotores de genes oncosupresores, esto hace que se presente muy atractivo estudiar dicho mecanismo. Ya que en este estudio se ha demostrado que Cdc42 es crucial en el desarrollo de cáncer colorrectal y que uno de los mecanismos por los que ejerce su función es por el silenciamiento epigenético, de al menos el gen ID4. Sería interesante indagar en la posibilidad de que Cdc42 sea capaz de regular a estos complejos polycomb ya que estaría implicado en procesos generales de regulación epigenética, los cuales son relevantes en el desarrollo del cáncer (Esteller, 2008) (Figura 37).



**Figura 37. Hipótesis del mecanismo de regulación epigenética mediada por Cdc42.** Hipótesis de regulación donde Cdc42 regula la actividad de EZH2 desembocando en la alteración de los complejos polycomb que finalmente reprimirían la transcripción por metilación de los promotores de los genes como ID4 y p16INK4a.

## 6.6 Cdc42 como potencial diana terapéutica en CCR

El pronóstico de un paciente con cáncer colorrectal depende de la situación evolutiva del proceso, el tratamiento que recibe, de su estado clínico y de la naturaleza del tumor a nivel molecular. A medida que el estadio tumoral se incrementa en términos de profundidad de penetración del tumor en las capas intestinales e implicación de nódulos linfáticos, la posibilidad de cura únicamente por cirugía disminuye (Markowitz *et al.*, 2002).

Por tanto, las probabilidades de recurrencia local y de supervivencia dependen en gran medida del estadio TNM. La invasión a ganglios linfáticos es un marcador de peor pronóstico inmediatamente después de la metástasis a distancia (M) (O'Connell *et al.*, 2004). Además, en 1999 el Colegio Americano de Patólogos, definió cuatro categorías de factores pronósticos que se refieren a la situación evolutiva del proceso y la naturaleza del tumor primario (Compton *et al.*, 2000). En la categoría I, donde se englobaban factores pronóstico basados en múltiples datos estadísticos demostrados en pacientes, se encontraba, entre otros, la metástasis en los ganglios linfáticos evaluados patológicamente. En la categoría IIa donde se comprende posibles factores pronósticos y predictivos que han sido muy estudiados biológica y/o clínicamente, pero que precisan de una validación estadística, se encontraba el grado histológico. Se ha atribuido un importante papel biológico al grado tumoral, ya que en base a este parámetro puede afectar en el tratamiento que recibe el paciente (Greene *et al.*, 2002; Van Cutsem, 2007).

Aún no se dispone de factores pronóstico que marquen, de forma específica, el cambio a una enfermedad invasiva y metastásica en este tipo tumoral. En este trabajo se propone a Cdc42 como un nuevo marcador de malignidad avanzada en CCR. Ya que la invasión linfática es uno de los primeros pasos en las metástasis a distancia, también se propone a esta GTPasa Rho como una nueva diana terapéutica para la prevención de la progresión hacia la metástasis en este tipo tumoral. Por otro lado, el estudio profundizado de los mecanismos moleculares que están bajo el control de Cdc42, permitiría un mejor entendimiento de los eventos moleculares claves en la progresión del cáncer colorrectal. En este sentido, se han detectado una serie de dianas transcripcionales silenciadas por Cdc42 que se proponen como posibles genes supresores tumorales en CCR, como son ID4, p16, CACNA2D2 y KIAA1456. Debido a esto, parece que Cdc42 controla la expresión de una variedad de genes implicados en procesos de proliferación, diferenciación e invasión celular convirtiendo a Cdc42 en una diana terapéutica atractiva para la inhibición de varias etapas de la progresión tumoral en CCR. No obstante, es preciso estudiar con mayor detalle las relaciones encontradas para un mejor entendimiento del control de estos procesos dependientes de la expresión de Cdc42. El reciente descubrimiento de una molécula pequeña denominada secramina, que inhibe específicamente las funciones dependientes de Cdc42 como son, el tráfico de membranas (Pelish *et al.*, 2006; Pula & Poole, 2008) y la propagación celular (Xu *et al.*, 2006), proporciona una nueva estrategia para la inhibición de Cdc42. Sería interesante investigar la inactivación de Cdc42 por esta molécula en este tipo tumoral como una nueva estrategia antitumoral.



## **CONCLUSIONES**





## 7 Conclusiones

1. La GTPasa Rho Cdc42 se encuentra significativamente sobreexpresada en cáncer colorrectal, siendo este estudio la primera evidencia de la contribución de Cdc42 en este tipo tumoral. Dicha sobreexpresión se asocia con dos importantes marcadores de malignidad, como son el incremento del número de ganglios linfáticos afectados por células tumorales y tumores pobremente diferenciados.
2. Se han identificado una serie de genes cuya transcripción está regulada por Cdc42. Estos genes están implicados en funciones celulares asociadas al proceso carcinogénico, las cuales podrían explicar las características oncogénicas de Cdc42 encontradas en cáncer colorrectal.
3. Cdc42 inhibe la transcripción de los potenciales genes supresores tumorales ID4, TWIST1, CACNA2D2, KIAA1456 y p16INK4a en la línea celular derivada de un adenocarcinoma colorrectal humano, SW620. El mecanismo de regulación transcripcional dependiente de Cdc42 es debido a la hipermetilación de los promotores de ID4, p16INK4a y TWIST1, y por un mecanismo aún desconocido para los genes CACNA2D2 y KIAA1456.
4. En este trabajo se aporta la primera evidencia del silenciamiento de CACNA2D2 en cáncer colorrectal. Los niveles reducidos de este gen se asocian con el incremento del número de ganglios linfáticos invadidos por células cancerígenas y con la infiltración linfo-vascular. Sin embargo no se ha encontrado un mecanismo que relacione los niveles de Cdc42 con el silenciamiento de CACNA2D2 por lo que este descubrimiento merece ser investigado en mayor profundidad por su posible significancia clínica.
5. El gen KIAA1456 se encuentra significativamente silenciado en cáncer colorrectal. La pérdida de expresión de este gen se asocia con una menor diferenciación de los tumores. El silenciamiento de KIAA1456 se correlaciona de forma significativa con la sobreexpresión de Cdc42.

6. El estudio de la expresión génica de p16INK4a en líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal revela un silenciamiento de este gen debido a la hipermetilación de su promotor. Sin embargo, se encuentra significativamente sobreexpresado en muestras clínicas, donde se ha observado una expresión específica en los bordes invasivos del tumor. La expresión de p16INK4a no está asociada con los niveles de Cdc42 en los tejidos tumorales analizados. Dada la trascendencia del gen p16INK4a será importante investigar el mecanismo que explique la discrepancia entre lo observado en las líneas tumorales y las muestras clínicas.
7. El gen TWIST1 se encuentra silenciado en líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal debido a la hipermetilación de su promotor. No obstante, este gen se encuentra significativamente sobreexpresado en muestras clínicas donde no se encontró asociación con la expresión de Cdc42. La sobreexpresión de TWIST1 se asocia con la invasión a ganglios linfáticos y con el sexo masculino. Este gen se ha encontrado expresado específicamente en zonas del tumor donde las células están sufriendo la EMT. Esta serie de evidencias suponen el primer estudio de la relevancia de TWIST1 en cáncer colorrectal.
8. La pérdida de la expresión del gen ID4 se asocia de forma significativa con la sobreexpresión de Cdc42 en muestras de pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal. El mecanismo de silenciamiento transcripcional de este gen es principalmente por hipermetilación de su promotor, si bien, este mecanismo no parece ser el único proceso involucrado en su regulación.
9. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la GTPasa Cdc42 juega un papel relevante en el proceso de carcinogénesis humana mediante la alteración de los patrones de expresión de un conjunto de genes relacionados con importantes aspectos clínicos y mediante su asociación con parámetros de malignidad tumoral como son la afectación de ganglios linfáticos o el grado de diferenciación tumoral, una demostración de su posible utilidad en la clínica. La relevancia clínica de Cdc42 identifica a esta GTPasa como una nueva diana potencial en el tratamiento de tumores colorrectales.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8 Bibliografía

Abe M, Watanabe N, McDonell N, Takato T, Ohira M, Nakagawara A *et al* (2008). Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology* **74**: 50-60.

Abraham MT, Kuriakose MA, Sacks PG, Yee H, Chiriboga L, Bearer EL *et al* (2001). Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope* **111**: 1285-9.

Affar el B, Gay F, Shi Y, Liu H, Huarte M, Wu S *et al* (2006). Essential dosage-dependent functions of the transcription factor yin yang 1 in late embryonic development and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **26**: 3565-81.

Alberts AS, Geneste O, Treisman R (1998). Activation of SRF-regulated chromosomal templates by Rho-family GTPases requires a signal that also induces H4 hyperacetylation. *Cell* **92**: 475-87.

Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM (1983). Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 1707-11.

Alitalo K, Winqvist R, Lin CC, de la Chapelle A, Schwab M, Bishop JM (1984). Aberrant expression of an amplified c-myc oncogene in two cell lines from a colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4534-8.

Armstrong SA, Hannah VC, Goldstein JL, Brown MS (1995). CAAX geranylgeranyl transferase transfers farnesyl as efficiently as geranylgeranyl to RhoB. *J Biol Chem* **270**: 7864-8.

Aznar S, Valeron PF, del Rincon SV, Perez LF, Perona R, Lacal JC (2001). Simultaneous tyrosine and serine phosphorylation of STAT3 transcription factor is involved in Rho A GTPase oncogenic transformation. *Mol Biol Cell* **12**: 3282-94.

Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB *et al* (2003). Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* **3**: 89-95.

Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J *et al* (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**: 84-9.

Baylin SB, Ohm JE (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* **6**: 107-16.

Benitah SA, Valeron PF, Lacal JC (2003). ROCK and nuclear factor-kappaB-dependent activation of cyclooxygenase-2 by Rho GTPases: effects on tumor growth and therapeutic consequences. *Mol Biol Cell* **14**: 3041-54.

Benitah SA, Valeron PF, van Aelst L, Marshall CJ, Lacal JC (2004). Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* **1705**: 121-32.

Berenjeno IM, Nunez F, Bustelo XR (2007). Transcriptomal profiling of the cellular transformation induced by Rho subfamily GTPases. *Oncogene* **26**: 4295-305.

Berthold J, Schenkova K, Rivero F (2008). Rho GTPases of the RhoBTB subfamily and tumorigenesis. *Acta Pharmacol Sin* **29**: 285-95.

Bigey P, Ramchandani S, Theberge J, Araujo FD, Szyf M (2000). Transcriptional regulation of the human DNA Methyltransferase (dnmt1) gene. *Gene* **242**: 407-18.

Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P *et al* (1987). Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* **328**: 614-6.

Boettner B, Van Aelst L (2002). The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* **286**: 155-74.

Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**: 865-77.

Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **24**: 203-16.

Bouzahzah B, Albanese C, Ahmed F, Pixley F, Lisanti MP, Segall JD *et al* (2001). Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. *Mol Med* **7**: 816-30.

Braga VM, Yap AS (2005). The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 466-74.

Brenner C, Deplus R, Didelot C, Loriot A, Vire E, De Smet C *et al* (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *Embo J* **24**: 336-46.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550-3.

Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B *et al* (2001). Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* **93**: 691-9.

Carboni GL, Gao B, Nishizaki M, Xu K, Minna JD, Roth JA *et al* (2003). CACNA2D2-mediated apoptosis in NSCLC cells is associated with alterations of the intracellular calcium signaling and disruption of mitochondria membrane integrity. *Oncogene* **22**: 615-26.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A *et al* (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**: 2933-42.

Cerione RA (2004). Cdc42: new roads to travel. *Trends Cell Biol* **14**: 127-32.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* **22**: 2990-7.

Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 355-66.

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR *et al* (2000). Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* **124**: 979-94.

Compton CC, Greene FL (2004). The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* **54**: 295-308.

Cottrell SE, Laird PW (2003). Sensitive detection of DNA methylation. *Ann N Y Acad Sci* **983**: 120-30.

Czuchra A, Wu X, Meyer H, van Hengel J, Schroeder T, Geffers R *et al* (2005). Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell* **16**: 4473-84.

Chan AS, Tsui WY, Chen X, Chu KM, Chan TL, Chan AS *et al* (2003). Downregulation of ID4 by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene* **22**: 6946-53.

Cheah PY (2008). Recent advances in colorectal cancer genetics and diagnostics. *Crit Rev Oncol Hematol*.

Chen F, Ma L, Parrini MC, Mao X, Lopez M, Wu C *et al* (2000). Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol* **10**: 758-65.

Chen ZF, Behringer RR (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* **9**: 686-99.



Cheng YW, Shawber C, Notterman D, Paty P, Barany F (2006). Multiplexed profiling of candidate genes for CpG island methylation status using a flexible PCR/LDR/Universal Array assay. *Genome Res* **16**: 282-9.

Chow LS, Lo KW, Kwong J, To KF, Tsang KS, Lam CW *et al* (2004). RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* **109**: 839-47.

Chuang TH, Hahn KM, Lee JD, Danley DE, Bokoch GM (1997). The small GTPase Cdc42 initiates an apoptotic signaling pathway in Jurkat T lymphocytes. *Mol Biol Cell* **8**: 1687-98.

D'Emilia J, Bulovas K, D'Ercole K, Wolf B, Steele G, Jr., Summerhayes IC (1989). Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon. *Oncogene* **4**: 1233-9.

Dai CY, Furth EE, Mick R, Koh J, Takayama T, Niitsu Y *et al* (2000). p16(INK4a) expression begins early in human colon neoplasia and correlates inversely with markers of cell proliferation. *Gastroenterology* **119**: 929-42.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S *et al* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949-54.

Debidda M, Wang L, Zang H, Poli V, Zheng Y (2005). A role of STAT3 in Rho GTPase-regulated cell migration and proliferation. *J Biol Chem* **280**: 17275-85.

Dobbin K, Shih JH, Simon R (2003). Questions and answers on design of dual-label microarrays for identifying differentially expressed genes. *J Natl Cancer Inst* **95**: 1362-9.

Dovas A, Couchman JR (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* **390**: 1-9.

Dutton A, Woodman CB, Chukwuma MB, Last JI, Wei W, Vockerodt M *et al* (2007). Bmi-1 is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1 and regulates the expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells. *Blood* **109**: 2597-603.

Eisenmann KM, McCarthy JB, Simpson MA, Keely PJ, Guan JL, Tachibana K *et al* (1999). Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas. *Nat Cell Biol* **1**: 507-13.

Erickson JW, Zhang C, Kahn RA, Evans T, Cerione RA (1996). Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **271**: 26850-4.

Esteller M (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**: 5427-40.

Esteller M (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**: 1148-59.

Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK *et al* (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* **10**: 3001-7.

Etienne-Manneville S (2004). Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* **117**: 1291-300.

Etienne-Manneville S, Hall A (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-35.

Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K *et al* (2003). DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer* **107**: 970-5.

Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lange J, Lapidus A *et al* (2004). Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res* **64**: 4442-52.

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM *et al* (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* **247**: 49-56.

Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-67.

Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M (1988). Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* **48**: 1159-61.

Feinberg AP, Vogelstein B (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**: 89-92.

Flanagan JM, Healey S, Young J, Whitehall V, Trott DA, Newbold RF *et al* (2004). Mapping of a candidate colorectal cancer tumor-suppressor gene to a 900-kilobase region on the short arm of chromosome 8. *Genes Chromosomes Cancer* **40**: 247-60.

Foster R, Hu KQ, Lu Y, Nolan KM, Thissen J, Settleman J (1996). Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol* **16**: 2689-99.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G *et al* (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* **37**: 391-400.

Friedl P, Wolf K (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**: 362-74.

Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B (2002). Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* **87**: 635-44.

Fritz G, Just I, Kaina B (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* **81**: 682-7.

Gadea G, Sanz-Moreno V, Self A, Godi A, Marshall CJ (2008). DOCK10-Mediated Cdc42 Activation Is Necessary for Amoeboid Invasion of Melanoma Cells. *Curr Biol*.

Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K *et al* (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* **9**: 1392-400.

Gao B, Sekido Y, Maximov A, Saad M, Forgacs E, Latif F *et al* (2000). Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J Biol Chem* **275**: 12237-42.

Garinis GA, Menounos PG, Spanakis NE, Papadopoulos K, Karavitis G, Parassi I *et al* (2002). Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. *J Pathol* **198**: 442-9.

Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF *et al* (2000). Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* **24**: 300-3.

Giehl K, Menke A (2008). Microenvironmental regulation of E-cadherin-mediated adherens junctions. *Front Biosci* **13**: 3975-85.

Gil J, Bernard D, Peters G (2005). Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer. *DNA Cell Biol* **24**: 117-25.

Gomez del Pulgar T, Bandres E, Espina C, Valdes-Mora F, Perez-Palacios R, Garcia-Amigot F *et al* (2007). Differential expression of Rac1 identifies its target genes and its contribution to progression of colorectal cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 2289-302.

Gomez del Pulgar T, Benitah SA, Valeron PF, Espina C, Lacal JC (2005). Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays* **27**: 602-13.

Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B (2006). Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* **25**: 1125-42.

Gouw LG, Reading NS, Jenson SD, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS (2005). Expression of the Rho-family GTPase gene RHOF in lymphocyte subsets and malignant lymphomas. *Br J Haematol* **129**: 531-3.

Greene FL, Stewart AK, Norton HJ (2002). A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Ann Surg* **236**: 416-21; discussion 421.

Greenspan EJ, Jablonski MA, Rajan TV, Levine J, Belinsky GS, Rosenberg DW (2006). Epigenetic alterations in RASSF1A in human aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* **27**: 1316-22.

Guan RJ, Fu Y, Holt PR, Pardee AB (1999). Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology* **116**: 1063-71.

Gupton SL, Gertler FB (2007). Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE* **2007**: re5.

Hagiwara K, Nagai H, Li Y, Ohashi H, Hotta T, Saito H (2007). Frequent DNA methylation but not mutation of the ID4 gene in malignant lymphoma. *J Clin Exp Hematop* **47**: 15-8.

Hajra KM, Chen DY, Fearon ER (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* **62**: 1613-8.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Heasman SJ, Ridley AJ (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 690-701.

Herman JG, Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* **349**: 2042-54.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9821-6.

Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE *et al* (1995). Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* **55**: 4525-30.

Hernandez-Munoz I, Taghavi P, Kuijl C, Neefjes J, van Lohuizen M (2005). Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *Mol Cell Biol* **25**: 11047-58.

Hesson L, Bieche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER *et al* (2004). Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* **23**: 2408-19.

Hill CS, Wynne J, Treisman R (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**: 1159-70.

Hinoi T, Loda M, Fearon ER (2003). Silencing of CDX2 expression in colon cancer via a dominant repression pathway. *J Biol Chem* **278**: 44608-16.

Holliday R (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science* **238**: 163-70.

Huang M, Prendergast GC (2006). RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol* **21**: 213-8.

Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF (1999). Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* **35**: 335-51.

Jaffe AB, Hall A (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-69.

Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP *et al* (1998). Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* **42**: 673-9.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T *et al* (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* **58**: 71-96.

Jen Y, Manova K, Benezra R (1996). Expression patterns of Id1, Id2, and Id3 are highly related but distinct from that of Id4 during mouse embryogenesis. *Dev Dyn* **207**: 235-52.

Ji L, Minna JD, Roth JA (2005). 3p21.3 tumor suppressor cluster: prospects for translational applications. *Future Oncol* **1**: 79-92.

Ji L, Nishizaki M, Gao B, Burbee D, Kondo M, Kamibayashi C *et al* (2002). Expression of several genes in the human chromosome 3p21.3 homozygous deletion region by an adenovirus vector results in tumor suppressor activities in vitro and in vivo. *Cancer Res* **62**: 2715-20.

Jones PA, Baylin SB (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**: 415-28.

Jung ID, Lee J, Yun SY, Park CG, Choi WS, Lee HW *et al* (2002). Cdc42 and Rac1 are necessary for autotaxin-induced tumor cell motility in A2058 melanoma cells. *FEBS Lett* **532**: 351-6.

Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y *et al* (2004). Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 4799-805.

Kaneda A, Feinberg AP (2005). Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res* **65**: 11236-40.

Kang GH, Lee S, Cho NY, Gandamihardja T, Long TI, Weisenberger DJ *et al* (2008). DNA methylation profiles of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis. *Lab Invest* **88**: 161-70.

Karpf AR, Peterson PW, Rawlins JT, Dalley BK, Yang Q, Albertsen H *et al* (1999). Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14007-12.

Kee Y, Bronner-Fraser M (2001). Id4 expression and its relationship to other Id genes during avian embryonic development. *Mech Dev* **109**: 341-5.

Kim BN, Yamamoto H, Ikeda K, Damdinsuren B, Sugita Y, Ngan CY *et al* (2005). Methylation and expression of p16INK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues. *Int J Oncol* **26**: 1217-26.

Kim JH, Yoon SY, Kim CN, Joo JH, Moon SK, Choe IS *et al* (2004). The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Lett* **203**: 217-24.

Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-70.

Kirberg J, Gschwendner C, Dangy JP, Ruckerl F, Frommer F, Bachl J (2005). Proviral integration of an Abelson-murine leukemia virus deregulates BCLF-expression in the hypermutating pre-B cell line 18-81. *Mol Immunol* **42**: 1235-42.

Knudson AG (2000). Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* **34**: 1-19.

Kondo T, Raff M (2000). The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J* **19**: 1998-2007.

Kondo Y, Issa JP (2004). Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* **23**: 29-39.

Kondo Y, Shen L, Issa JP (2003). Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol* **23**: 206-15.

Kotake Y, Cao R, Viatour P, Sage J, Zhang Y, Xiong Y (2007). pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev* **21**: 49-54.



Kristensen LS, Mikeska T, Krypuy M, Dobrovic A (2008). Sensitive Melting Analysis after Real Time- Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic Acids Res* **36**: e42.

Lerman MI, Minna JD (2000). The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* **60**: 6116-33.

Liang G, Gonzales FA, Jones PA, Orntoft TF, Thykjaer T (2002). Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* **62**: 961-6.

Liang JT, Chang KJ, Chen JC, Lee CC, Cheng YM, Hsu HC *et al* (1999). Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* **57**: 149-56.

Lind GE, Thorstensen L, Lovig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO *et al* (2004). A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer* **3**: 28.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-8.

Lyng H, Brovig RS, Svendsrud DH, Holm R, Kaalhus O, Knutstad K *et al* (2006). Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC Genomics* **7**: 268.

Macaluso M, Montanari M, Cinti C, Giordano A (2005). Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin Oncol* **32**: 452-7.

Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L *et al* (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* **13**: 2207-17.

Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK. (2002). Focus on colon cancer. *Cancer Cell* **1**: 233-6.

Massague J, Chen YG (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **14**: 627-44.

Merajver SD, Usmani SZ (2005). Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**: 291-8.

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC *et al* (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* **1**: 686-92.

Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* **152**: 111-26.

Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC (1998). Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem* **273**: 12779-85.

Narumiya S, Yasuda S (2006). Rho GTPases in animal cell mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 199-205.

Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J *et al* (2001). Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* **93**: 583-96.

Nobes CD, Hall A (1995a). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**: 456-9.

Nobes CD, Hall A (1995b). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62.

- Noetzel E, Veeck J, Niederacher D, Galm O, Horn F, Hartmann A *et al* (2008). Promoter methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of tumour recurrence in human breast cancer. *BMC Cancer* **8**: 154.
- O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY (2004). Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* **96**: 1420-5.
- Ohhara M, Esumi M, Kurosu Y (1996). Activation but not inactivation of the MTS1 gene is associated with primary colorectal carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* **226**: 791-5.
- Olson MF, Ashworth A, Hall A (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**: 1270-2.
- Ordway JM, Williams K, Curran T (2004). Transcription repression in oncogenic transformation: common targets of epigenetic repression in cells transformed by Fos, Ras or Dnmt1. *Oncogene* **23**: 3737-48.
- Pagliuca A, Cannada-Bartoli P, Lania L (1998). A role for Sp and helix-loop-helix transcription factors in the regulation of the human Id4 gene promoter activity. *J Biol Chem* **273**: 7668-74.
- Palmqvist R, Rutegard JN, Bozoky B, Landberg G, Stenling R (2000). Human colorectal cancers with an intact p16/cyclin D1/pRb pathway have up-regulated p16 expression and decreased proliferation in small invasive tumor clusters. *Am J Pathol* **157**: 1947-53.
- Patel S, Takagi KI, Suzuki J, Imaizumi A, Kimura T, Mason RM *et al* (2005). RhoGTPase activation is a key step in renal epithelial mesenchymal transdifferentiation. *J Am Soc Nephrol* **16**: 1977-84.
- Pelish HE, Peterson JR, Salvarezza SB, Rodriguez-Boulán E, Chen JL, Stamnes M *et al* (2006). Secramine inhibits Cdc42-dependent functions in cells and Cdc42 activation in vitro. *Nat Chem Biol* **2**: 39-46.

Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* **11**: 463-75.

Polakis P, Hart M, Rubinfeld B (1999). Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* **470**: 23-32.

Pula G, Poole AW (2008). Critical roles for the actin cytoskeleton and cdc42 in regulating platelet integrin alpha2beta1. *Platelets* **19**: 199-210.

Qiu RG, Abo A, McCormick F, Symons M (1997). Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol* **17**: 3449-58.

Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Gutierrez R, Martinez-Pineiro L, Sanchez J, Bonilla F *et al* (2002). Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* **296**: 580-3.

Ramirez N, Bandres E, Navarro A, Pons A, Jansa S, Moreno I *et al* (2008). Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions. *Eur J Cancer*.

Rihet S, Vielh P, Camonis J, Goud B, Chevillard S, de Gunzburg J (2001). Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**: 733-8.

Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, Hamelin R, Yamamoto H, Boix-Chornet M *et al* (2006). A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat Genet* **38**: 566-9.

Rossi D, Capello D, Gloghini A, Franceschetti S, Paulli M, Bhatia K *et al* (2004). Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. *Haematologica* **89**: 154-64.

Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT *et al* (2002). AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **23**: 201-5.

Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**: 27-37.

Shames DS, Minna JD, Gazdar AF (2007). Methods for detecting DNA methylation in tumors: from bench to bedside. *Cancer Lett* **251**: 187-98.

Smith E, De Young NJ, Pavey SJ, Hayward NK, Nancarrow DJ, Whiteman DC *et al* (2008). Similarity of aberrant DNA methylation in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mol Cancer* **7**: 75.

Sova P, Feng Q, Geiss G, Wood T, Strauss R, Rudolf V *et al* (2006). Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**: 114-23.

Sparmann A, van Lohuizen M (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 846-56.

Su IH, Dobenecker MW, Dickinson E, Oser M, Basavaraj A, Marqueron R *et al* (2005). Polycomb group protein *ezh2* controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* **121**: 425-36.

Thiery JP (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 740-6.

Tominaga O, Nita ME, Nagawa H, Fujii S, Tsuruo T, Muto T (1997). Expressions of cell cycle regulators in human colorectal cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* **88**: 855-60.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8681-6.

Tsou JA, Galler JS, Siegmund KD, Laird PW, Turla S, Cozen W *et al* (2007). Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol Cancer* **6**: 70.

Tsunozaiki H, Yoshinaga K, Kumagai J, Sugihara K (2002). Cyclooxygenase-2 overexpression in colorectal cancer is associated with non-polypoid growth. *Jpn J Clin Oncol* **32**: 167-71.

Tucci MG, Lucarini G, Brancorsini D, Zizzi A, Pagnaloni A, Giacchetti A *et al* (2007). Involvement of E-cadherin, beta-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* **157**: 1212-6.

Uhm KO, Lee ES, Lee YM, Kim HS, Park YN, Park SH (2008). Aberrant promoter CpG islands methylation of tumor suppressor genes in cholangiocarcinoma. *Oncol Res* **17**: 151-7.

Umetani N, Mori T, Koyanagi K, Shinozaki M, Kim J, Giuliano AE *et al* (2005). Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Oncogene* **24**: 4721-7.

Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS (2004). Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Clin Cancer Res* **10**: 7475-83.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**: 2295-322.

Van Cutsem EJ (2007). Colon cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol* **18 Suppl 2**: ii21-2.

van Hengel J, D'Hooge P, Hooghe B, Wu X, Libbrecht L, De Vos R *et al* (2008). Continuous cell injury promotes hepatic tumorigenesis in cdc42-deficient mouse liver. *Gastroenterology* **134**: 781-92.

Vega FM, Ridley AJ (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* **582**: 2093-101.

Vernon AE, LaBonne C (2004). Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr Biol* **14**: R719-21.

Vesuna F, van Diest P, Chen JH, Raman V (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **367**: 235-41.

Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C *et al* (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**: 871-4.

Visvader JE, Lindeman GJ (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **8**: 755-68.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M *et al* (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**: 525-32.

Wang X, Feng Y, Xu L, Chen Y, Zhang Y, Su D *et al* (2008). YY1 restrained cell senescence through repressing the transcription of p16. *Biachim Biophys Acta* **1783**: 1876-83.

Wennerberg K, Der CJ (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**: 1301-12.

White RL (1998). Tumor suppressing pathways. *Cell* **92**: 591-2.

Willis ND, Przyborski SA, Hutchison CJ, Wilson RG (2008). Colonic and colorectal cancer stem cells: progress in the search for putative biomarkers. *J Anat* **213**: 59-65.

Wright FC, Law CH, Last L, Khalifa M, Arnaout A, Naseer Z *et al* (2003). Lymph node retrieval and assessment in stage II colorectal cancer: a population-based study. *Ann Surg Oncol* **10**: 903-9.

Wu F, Chen Y, Li Y, Ju J, Wang Z, Yan D (2008). RNA-interference-mediated Cdc42 silencing down-regulates phosphorylation of STAT3 and suppresses growth in human bladder-cancer cells. *Biotechnol Appl Biochem* **49**: 121-8.

Wu WJ, Tu S, Cerione RA (2003). Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. *Cell* **114**: 715-25.

Wu X, Li S, Chrostek-Grashoff A, Czuchra A, Meyer H, Yurchenco PD *et al* (2007). Cdc42 is crucial for the establishment of epithelial polarity during early mammalian development. *Dev Dyn* **236**: 2767-78.

Wu X, Quondamatteo F, Lefever T, Czuchra A, Meyer H, Chrostek A *et al* (2006). Cdc42 controls progenitor cell differentiation and beta-catenin turnover in skin. *Genes Dev* **20**: 571-85.

Xu B, Pelish H, Kirchhausen T, Hammond GB (2006). Large scale synthesis of the Cdc42 inhibitor secramine A and its inhibition of cell spreading. *Org Biomol Chem* **4**: 4149-57.

Yamada Y, Jackson-Grusby L, Linhart H, Meissner A, Eden A, Lin H *et al* (2005). Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13580-5.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C *et al* (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**: 927-39.

Yang J, Mani SA, Weinberg RA (2006a). Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* **66**: 4549-52.

Yang L, Wang L, Geiger H, Cancelas JA, Mo J, Zheng Y (2007). Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5091-6.

Yang L, Wang L, Zheng Y (2006b). Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell* **17**: 4675-85.



Yasuda S, Ocegüera-Yanez F, Kato T, Okamoto M, Yonemura S, Terada Y *et al* (2004). Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature* **428**: 767-71.

Yasuda S, Taniguchi H, Ocegüera-Yanez F, Ando Y, Watanabe S, Monypenny J *et al* (2006). An essential role of Cdc42-like GTPases in mitosis of HeLa cells. *FEBS Lett* **580**: 3375-80.

Yu L, Liu C, Vandeusen J, Becknell B, Dai Z, Wu YZ *et al* (2005). Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet* **37**: 265-74.

Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C *et al* (2002). Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* **62**: 6451-5.

Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD (2002). Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* **21**: 6915-35.

Zhang Q, Wang HY, Marzec M, Raghunath PN, Nagasawa T, Wasik MA (2005). STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6948-53.



**ANEXO**



## 9 Anexo publicaciones

### 9.1 Publicaciones que forman parte de la Tesis

**Fátima Valdés-Mora<sup>#</sup>**, Teresa Gómez del Pulgar<sup>#</sup>, Eva Bandrés, Rosa Pérez-Palacios, Carolina Espina, Paloma Cejas, Miguel Angel García-Cabezas, Manuel Nistal, Enrique Casado, Manuel González-Barón, Jesús García-Foncillas y Juan Carlos Lacal. *Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism* (Int J Oncol. 2008 Jul;33(1):185-93.).

**Fátima Valdés-Mora<sup>#</sup>**, Teresa Gómez del Pulgar<sup>#</sup>, Eva Bandrés, Paloma Cejas, Ana Ramírez de Molina, Rosa Pérez-Palacios, David Gallego-Ortega, Miguel Angel García-Cabezas, Enrique Casado, Manuel Nistal, Manuel González-Baron, Jesús García-Foncillas y Juan Carlos Lacal. *TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male gender in primary colorectal cancer* (Aceptado Agosto 2008 Ann Surg Oncol.).

### 9.2 Otras publicaciones durante el desarrollo de la Tesis

Teresa Gómez del Pulgar, Eva Bandrés, Carolina Espina, **Fátima Valdés-Mora**, Rosa Pérez-Palacios, Fermín García-Amigot, Jesús García-Foncillas and Juan Carlos Lacal. *Differential expression of Rac1 identifies its target genes and its contribution to progression of colorectal cancer* (Int. J. Biochem. Cell. Biol 2007;39 (12):2289-302).

David Gallego-Ortega, Ana Ramirez de Molina, Maria Angeles Ramos, **Fátima Valdés-Mora**, María G. Barderas, Jacinto Sarmentero-Estrada y Juan Carlos Lacal. *Differential role of choline kinase alpha and beta isoforms in human carcinogenesis* (Manuscrito en revisión 2008).

